



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

GIRLENE MARIA DE ALENCAR

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE PALMA FORRAGEIRA (*Opuntia* spp.) ACESSADA
POR MARCADOR ISSR**

AREIA
2022

GIRLENE MARIA DE ALENCAR

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE PALMA FORRAGEIRA (*Opuntia* spp.) ACESSADA
POR MARCADOR ISSR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Agronomia da Universidade
Federal da Paraíba, como requisito parcial
para obtenção ao título de Mestre.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Maílson Monteiro do
Rego

Co-orientador: Dr^o. Daniel Oliveira Jordão do
Amaral

**AREIA
2022**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A368d Alencar, Girlene Maria de.

Diversidade genética de palma forrageira (*Opuntia* spp.) acessada por marcador ISSR / Girlene Maria de Alencar. - Areia:UFPB/CCA, 2022.

55 f. : il.

Orientação: Mailson Monteiro do Rego.

Coorientação: Daniel Oliveira Jordão do Amaral.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. Recursos genéticos - Palma forrageira. 3. Melhoramento genético - Palma forrageira. I. Rego, Mailson Monteiro do. II. Amaral, Daniel Oliveira Jordão do. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(043.2)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**TÍTULO: DIVERSIDADE GENÉTICA DE PALMA FORRAGEIRA (*Opuntia* spp.)
ACESSADA POR MARCADOR ISSR**

AUTORA: GIRLENE MARIA DE ALENCAR

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo
Presidente da comissão examinadora

Profa. Dra. Elisanilda Ramalho do Rego
Examinadora interna

Profa. Dra. Priscila Alves Barroso
Examinadora externa

Areia – PB, 19 de novembro de 2021.

Esta dissertação é dedicada

Aos meus pais, Celso Liberalino de Alencar (in memorian) e Francisca Ribeiro de Araújo Alencar (in memorian), que sempre me passaram os melhores valores e nunca mediram esforços para que eu tivesse o melhor em educação.

Aos meus irmãos, Glácia, Gicélia e Francisco, meus exemplos de determinação.

Aos meus sobrinhos, que me alegam o ambiente quando estão presentes.

Ao meu grande companheiro de vida Henrique Vilar Gomes por todo apoio e incentivo a mim dedicados.

Especialmente aos meus filhos amados, Renata e Gabriel, a razão de todas as minhas realizações.

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, sabedoria e pela força que tem me dado para conseguir atingir meus objetivos.

Aos meus pais, Celso Liberalino de Alencar (*in memorian*) e Francisca Ribeiro de Araújo Alencar (*in memorian*), exemplos de honestidade e comprometimento, pela educação e valores passados.

Aos meus filhos amados Renata e Gabriel por serem o combustível essencial para minha caminhada.

Aos meus queridos irmãos Gicélia, Francisco e Glácia (futura mestra em Agronomia), pelo exemplo de determinação.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rego, pelos valiosos ensinamentos tanto do ponto de vista profissional como pessoal e principalmente pela análise dos dados de minha dissertação e confiança a mim depositada, minha eterna gratidão.

Ao meu co-orientador Daniel Oliveira Jordão do Amaral, companheiro de trabalho, pelos ensinamentos.

Em especial à Henrique Vilar Gomes, pelo companheirismo, carinho e incentivo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, Adriana, Bandeira, Elizanilda, Gleydyane, Jacinto, Mailson, Riselane e Walter, pela contribuição na minha carreira acadêmica.

Aos colegas do PPGAgro, Ayron, Cleomara, Cristine, Givaldo, Joseilson, Josué, Kathyane, João Elias, Thalyta, Witalo e tantos outros, pela amizade e apoio.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Análise do Trabalho – LAT/CT/UFPB, Prof. Bueno, Alinny, Álvaro, Erivaldo, Sawana, Ruan e Wilza, pelo apoio, incentivo e companheirismo e pelos momentos de descontração e brincadeiras, que tornam essa jornada acadêmica mais agradável.

Aos amigos do Instituto Nacional do Semi Árido – INSA, as Doutoradas Fabiane e Jucilene, e aos bolsistas, Ana Paula, Daniel, Lânia, Pollyana e Thyago, e demais funcionários que contribuíram na execução das coletas de dados do meu trabalho e pelo acolhimento que recebi nesse órgão.

Às minhas cunhadas e amigas Hélvia e Heloísa, a primeira por me abrigar em sua casa, me fazendo sentir como se fosse minha morada em Campina Grande, e a segunda, pela colaboração apoio na formatação das figuras.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma ao longo desta caminhada, meus sinceros agradecimentos.

*"Trabalhando de sol a sol, o nosso esforço diário é abençoado como a Flor da Palma
Forrageira"*

*Mãe Zuza (Maria da Saúde de Araújo), 1914-1990.
Beata e escritora Markenciana*

RESUMO

A palma forrageira (*Opuntia* spp.), que tem como centro de origem o México é o foco desse estudo que tem como objetivo realizar a caracterização da diversidade desse importante recurso genético que é essencial para a sustentabilidade do semiárido brasileiro, com a finalidade de munir de informações o Banco Ativo de Germoplasma para o melhoramento desses acessos, visando atingir as melhores características agronômicas com relação resistência à cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae*). Ao analisar a diversidade genética de 25 acessos das espécies: *Opuntia atropes* Rose, *O. cochenillifera* (L.) Salm Dyck subgênero *Nopalea*, *O. robusta* var. *larreyi* (F.A.C. Weber) Bravo, *O. robusta* Wendl., *O. stricta* Haw, *O. undulata* Griffiths e *O. joconostle* por meio de caracteres moleculares, utilizando os primers ISSR - 807, ISSR - 808, ISSR - 809, ISSR - 810, ISSR - 811, ISSR - 818, ISSR - 825, ISSR - 827, ISSR - 834, ISSR - 840, ISSR - 841, ISSR - 842 E ISSR - 868 com uma temperatura de anelamento de 50°, que amplificaram 1091 bandas, das quais 125 foram polimórficas e 14 monomórficas. Os fragmentos obtidos foram convertidos em uma matriz binária e a partir dessa matriz foi possível estabelecer a dissimilaridade genética entre os indivíduos. Essa técnica molecular mostrou-se eficiente para estimar que entre as espécies, os acessos 37 x 14 e 37 x 76 das espécies *O. cochenillifera* e *O. atropes*, respectivamente, são os mais indicados como potenciais genitores, já que têm dissimilaridade igual a 1 e tem mesmo nível de ploidia, $2n=2x=22$; e dentro das espécies, os acessos 13 x 14, 75 x 76 e 76 x 85 da espécie *O. atropes*, e da espécie *O. cochenillifera*, os acessos 37 x 42, com índice de divergência 1, são os mais indicados como potenciais genitores para o programa de melhoramento de *Opuntia* spp. Sobre o acesso 82 (*O. joconostle*) a análise molecular corrobora com a análise fenotípica e citológica de que este acesso, na verdade pertence à espécie *O. stricta*, devida à sua similaridade com acessos desse grupo, principalmente o acesso 75. O Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC) para o agrupamento de Tocher foi de 0,884** enquanto que a o Coeficiente de Correlação Cofenética obtido na análise de cluster foi 0,95***, evidenciando maior consistência no agrupamento hierárquico usando os critérios de Ward.

Palavras-chave: diversidade genética; recursos genéticos; melhoramento genético; *Opuntia* spp.; marcador ISSR.

ABSTRACT

The forage cactus (*Opuntia* spp.), which has Mexico as its center of origin, is the focus of this study, which aims to characterize the diversity of this important genetic resource that is essential for the sustainability of the Brazilian semiarid region, in order to provide the Active Germplasm Bank for the improvement of these accessions, aiming at achieving the best agronomic characteristics in relation to resistance to cochineal carmine (*Dactylopius opuntiae*). By analyzing the genetic diversity of 25 accessions of the species: *Opuntia atropes* Rose, *O. cochenillifera* (L.) Salm Dyck subgenus *Nopalea*, *O. robusta* var. *larreyi* (FAC Weber) Bravo, *O. robusta* Wendl., *O. stricta* Haw, *O. undulata* Griffiths and *O. joconostle* through molecular characters, using primers ISSR - 807, ISSR - 808, ISSR - 809, ISSR - 810, ISSR - 811, ISSR - 818, ISSR - 825, ISSR - 827, ISSR - 834, ISSR - 840, ISSR - 841, ISSR - 842 AND ISSR - 868 with an annealing temperature of 50°, which amplified 1091 bands, of which 125 were polymorphic and 14 monomorphic. The obtained fragments were converted into a binary matrix and from this matrix it was possible to establish the genetic dissimilarity between individuals. This molecular technique proved to be efficient to estimate that among species, the 37 x 14 and 37 x 76 accessions of the species *O. cochenillifera* and *O. atropes*, respectively, are the most indicated as potential parents, as they have dissimilarity equal to 1 and has the same ploidy level, $2n=2x=22$; and within the species, the accessions 13 x 14, 75 x 76 and 76 x 85 of the species *O. atropes*, and of the species *O. cochenillifera*, the accessions 37 x 42, with a divergence index of 1, are the most indicated as potential parents for the breeding program of *Opuntia* spp. Regarding accession 82 (*O. joconostle*), the molecular analysis corroborates the phenotypic and cytological analysis that this access actually belongs to the species *O. stricta*, due to its similarity with accessions in this group, mainly accession 75. The Coefficient of Cophenetic Correlation (CCC) for the Tocher cluster was 0.884** while the Cophenetic Correlation Coefficient obtained in the cluster analysis was 0.95***, showing greater consistency in the hierarchical cluster using Ward's criteria.

Keywords: genetic diversity; genetic resources; genetic improvement; *Opuntia* spp.; ISSR marker.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa do zoneamento de aptidão climática da cultura da palma forrageira (*Opuntia* sp.) para o Estado da Paraíba.13
- Figura 2.** Acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) cultivadas em bandejas de polipropileno sob telado com sombreamento de 60%. (A) Os 25 acessos usados neste estudo. (B) Coleta das raízes com auxílio de pinça e acondicionadas em tubos Eppendorf de 2,0 mL.33
- Figura 3.** Acessos de *Opuntia* spp. utilizados na análise molecular com marcador ISSR: *O. atropes* (a, b, d, e, g, w, y); *O. stricta* (c, f, h, l, v); *O. undulata* (k, o); *O. cochenilifera* (i, j, n, p, r, s, t, u); *O. robusta* (m, q) e *O. joconostle* (x).....40
- Figura 4.** Perfil eletroforético de agarose a 3% comparando os métodos I e II de extração e purificação de DNA. O método I (Qiagen mini) produziu maior número de bandas e mais nítidas. As setas indicam falhas na amplificação parcial ou total de algumas bandas do método II.41
- Figura 5.** Perfil eletroforético em gel de agarose de 19 acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) gerados com o oligonucleotídeo iniciador ISSR UBC810. M, marcador de peso molecular ladder 100 bp.....44
- Figura 6.** Perfil eletroforético de 19 acessos de *Opuntia* spp. em gel de agarose usando o primer ISSR UBC838. Não houve amplificação de nenhum loco. M, marcador de 1Kb ladder.....44
- Figura 7.** Matriz de dissimilaridade entre 25 acessos de *Opuntia* spp. do Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Nacional do Semi Árido (INSA), obtida por meio da distância genética de Jaccard (1912).46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Acessos, nome vulgar, origem e espécies de <i>Opuntia</i> spp., analisados neste estudo conversados <i>ex-situ</i> e pertencentes ao BAG do INSA.	32
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores ISSR (<i>Inter Single Sequence Repeats</i>) e suas respectivas sequências, usados neste estudo.....	36
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores ISSR (primers), sequência 5' - 3', número total de bandas amplificadas (NTA), número de locos polimórficos (NLP), número de locos monomórficos (NLM), porcentagem de locos polimórficos (PCP), e tamanho dos fragmentos amplificados (TFA) entre 25 acessos de palma forrageira (<i>Opuntia</i> spp.) do BAG do INSA, Campina Grande (PB).	42
Tabela 4. Grupos formados através do agrupamento dos 25 acessos de <i>Opuntia</i> spp. do banco ativo de germoplasma do INSA feito no pacote Biotools, no software R (SILVA et al., 2017), com base no método de Tocher (RAO, 1952).	50

LISTA DE SIGLAS

AuNPs – Nanopartículas de Ouro
ATP - Trifosfato de Adenosina
BAG - Banco Ativo de Germoplasma
CAM - Metabolismo específico do ácido crassuláceo
CCC - Coeficiente de Correlação Cofenética
CIA - Clorofórmio: álcool isoamílico
CTAB - Brometo de Cetyltrimethylammonium
CTP - Trifosfato de Citidina
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DNeasy - Desoxirribonuclease
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
dNTPs - Desoxinucleótidos Trifosfatos
GTP - Trifosfato de Guanosina
INSA - Instituto Nacional do Semi Árido
IRPA – Polimorfismo amplificado por Inter-Retrotransposon (do inglês, *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*)
ISSR - Repetições de sequência inter-simples (do inglês, *Inter-simple Sequence Repeats*)
NaCl – Cloreto de Sódio
NLM - número de locos monomórficos
NLP – Número de locos polimórficos
NTA – Número total de bandas amplificadas
PCP - porcentagem de locos polimórficos
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)
RAPD - DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*)
RFLP - Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*)
RNase - Ribonuclease
TAE - Tampão Tris-acetato-EDTA
TBE - Tampão Tris-borato-EDTA
TFA - Tamanho dos Fragmentos Amplificados em pares de base
TTP - Trifosfato de Timidina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
Caracterização Botânica.....	17
Centro de Origem.....	18
Importância Econômica	19
Marcadores moleculares ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeat</i> – Inter Repetições de Sequência Simples).....	20
Uso de marcadores moleculares na caracterização de Palma forrageira (<i>Opuntia</i> spp.).	22
<i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR (Reação em cadeia da polimerase).....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
OBJETIVO GERAL.....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
Material vegetal	31
Coleta e preparo do material vegetal	33
Extração de DNA.....	33
Método I.....	34
Método II.....	34
Oligonucleotídeos iniciadores (primers).....	35
Reações de ISSR-PCR	37
Análise de diversidade genética.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

INTRODUÇÃO

Entre as angiospermas, a Cactaceae é uma das mais distintas e bem-sucedidas famílias de plantas do Novo Mundo, com 1600 espécies, dentre estas o gênero *Opuntia* Miller contém mais de 200 espécies, ocorrendo desde a Canadá à Patagônia, sendo o México o centro de diversidade mais importante com 669 espécies e 244 subespécies (REYES-AGÜERO *et al.*, 2006). Possui vários subgêneros ou seções correspondentes aos principais; várias espécies são cultivadas para obter forragem ou frutas comestíveis (BARTHLOTT, *et al.*, 1993). O gênero *Opuntia*, recebeu esse nome devido a sua semelhança com uma planta espinhosa que crescia na cidade de Opus, Grécia. Nessa família, existem 178 gêneros com cerca de 2.000 espécies conhecidas (REYES-AGÜERO; *et al.*, 2006). Todavia nos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, estão presentes às espécies de palma mais utilizadas como forrageiras (GOIS; RIBEIRO, 2016).

O Brasil tinha em torno de 600 mil hectares de palma forrageira cultivada no Nordeste Brasileiro, contudo, com a ocorrência da Cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*), essa área foi drasticamente reduzida (NOGUEIRA FERRAZ *et al.*, 2003), até que no último censo agropecuário, no Brasil, a área colhida de palma forrageira (*Opuntia* spp.) foi de 126.925 ha, no Estado da Paraíba foram colhidos apenas 13.750 ha (IBGE, 2017), o que representou algo em torno de 11% da produção nacional. No semiárido brasileiro, o cultivo intensivo da palma para alimentação animal já é empregado pelos agricultores e o interesse por outros modos de sua utilização vem sendo paulatinamente despertado (SENAR, 2013).

Com base nesses dados, a SUDENE elaborou um mapa da distribuição, por Estado dentro da sua área de atuação, do número de estabelecimentos agropecuários produtores de palma forrageira, totalizando 125.725 propriedades, o que demonstra a importância e a potencialidade dessa cultura para a pecuária do semiárido brasileiro (SUDENE; INSA, 2020).

No seu mapa de zoneamento de aptidão climática da cultura da palma forrageira (*Opuntia* spp.) para o Estado da Paraíba, (SOUZA *et al.*, 2018b) constata-se que a mesorregião da Borborema é propícia ao cultivo desta cactácea (Figura 1), devido a suas condições de climáticas.

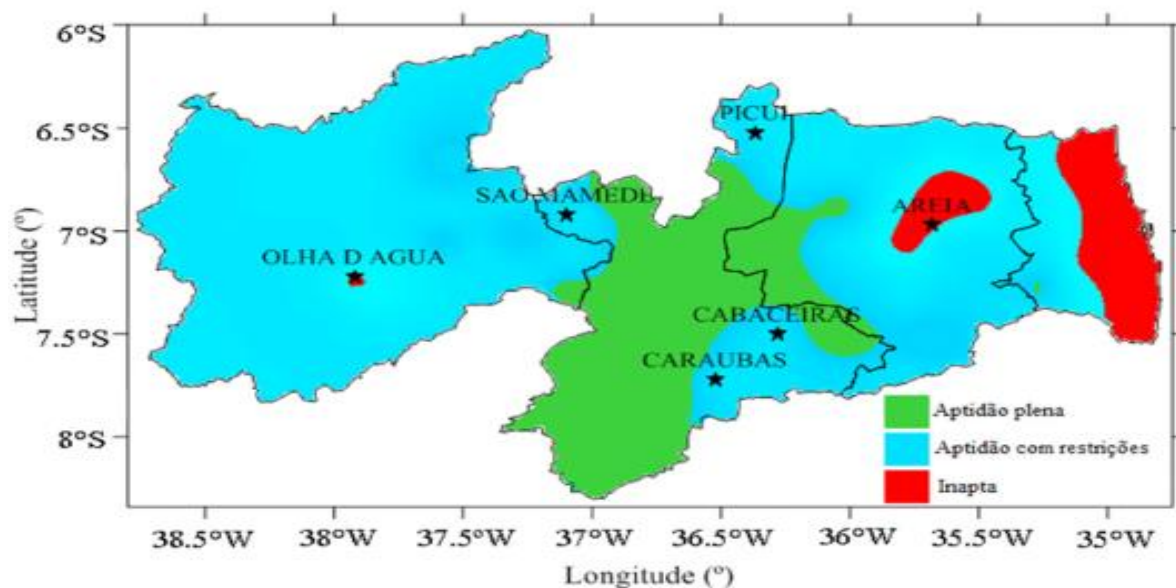


Figura 1. Mapa do zoneamento de aptidão climática da cultura da palma forrageira (*Opuntia* sp.) para o Estado da Paraíba.

Variedades de palma forrageira (*Opuntia* spp.), com boas características agronômicas, resistentes a cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae*) e de escama, com boa palatabilidade e rica em proteínas, são alguns atributos desejáveis. Para tanto, é necessário desenvolver metodologias de caracterização agronômica, bromatológica, citogenética e molecular para essas cactáceas, que permitam avaliar a diversidade genética e definir estratégias de manejo e/ou melhoramento genético. Neste sentido, SALEM *et al.*, (2020) afirmam que marcadores genéticos de ácidos nucleicos, cuja expressão independe do ambiente, podem ser utilizados para caracterizar populações e avaliar sua diversidade genética em níveis intra e interpulacionais.

Recentemente, marcadores ISSR (*inter single sequence repeats*), foram usados para avaliar a variabilidade genética de populações e orientar programas de manejo na tentativa de impedir a extinção de espécies de cactáceas (DOMINGUES *et al.*, 2017). O marcador ISSR é baseado na reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) (AMARAL *et al.*, 2020).

No entanto, ainda há um déficit de informações sobre os cactos, principalmente estudos envolvendo a diversidade genética de populações naturais da espécie, que poderiam, posteriormente, fornecer subsídios para melhoramento genético, programas conservacionistas e formação de bancos de germoplasma. Nesse contexto, estudos com diversidade genética podem elucidar eventos ao longo da história de vida e características ecológicas que podem ajudar a identificar grupos de populações vulneráveis aos fatores responsáveis pela erosão da diversidade genética (BARBOSA *et al.*, 2020).

Diversas estratégias vêm sendo empregadas para ampliar o conhecimento sobre os acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Palma Forrageira do INSA, e uma delas é

a biologia molecular, que por meio de marcadores de DNA pretende analisar o grau de variação genética e sua distribuição entre as diferentes espécies do BAG. O uso de marcadores moleculares nesse tipo de estudo é bastante difundido, devido a sua relativa simplicidade e a necessidade de pequenas quantidades de DNA da amostra.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos avaliar a diversidade genética de 25 acessos do BAG INSA entre e dentro das espécies de palma forrageira (*Opuntia spp.*), com base em 19 marcadores moleculares ISSR, indicar potenciais genitores para cruzamentos no programa de melhoramento de palma com aptidão forrageira, e ainda desenvolver metodologias de caracterização molecular tais como, propor protocolos de extração de DNA e análises de PCR com uso da eletroforese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, D. O. J. Do *et al.* Seleção de primers polimórficos para estudo de diversidade genética em cactáceas. **Multi-Science Journal**, 21 jan. 2020. v. 2, n. 3, p. 9. Disponível em: <<https://ifgoiano.edu.br/periodicos/index.php/multiscience/article/view/1074>>.

INSTITUTO NACIONAL DO SEMIÁRIDO – INSA Laboratório de Biologia Molecular Apostila de aulas práticas. 2021.

BARBOSA, F. Dos A. *et al.* Genetic variability in populations of *Pilosocereus catingicola* (Gürke) Byles & Rowley subsp. *salvadorensis* (Werderm.) Zappi (Cactaceae). **Research, Society and Development**, 27 jun. 2020. v. 9, n. 8, p. e126985521. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/5521>>.

BARTHLOTT, W., HUNT, D. R. **Flowering Plants ·Dicotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants, vol 2. Cactaceae.** [S.l.]: [s.n.], 1993.

CAMARA, B. Reação em cadeia da polimerase. **Biomedicina Padrao o blog da biomedicina**, 2020. p. 1–14. Disponível em: <<https://www.biomedicinapadrao.com.br/2011/10/reacao-em-cadeia-da-polimerase-pcr.html>>.

DAMAZIO DOMINGUES, S. *et al.* Seleção de primers para análise de Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) em *Cereus* sp. (Cactaceae). **Revista Biotecnologia & Ciência**, 2017. v. 6, n. 2, p. 46–54.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf. Phytochemical Bulletin.** Disponível em: <https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf>.

FONSECA, L. fundamentais para a Engenharia Genética. 2021. p. 1–11. Disponível em: <<https://profissaobiotec.com.br/5-ferramentas-fundamentais-para-a-engenharia-genetica/>>.

GOIS, G. C.; RIBEIRO, W. S. forrageira e sua introdução no Brasil. 2016. n. November.

IBGE. PRODUÇÃO PALMA FORRAGEIRA - IBGE tabela6615. **DADOS PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA**, 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6615>>. Acesso em: 7 set. 2021.

MARTINS, K. M.; DANTAS, M. C. Prática de eletroforese com materiais alternativos na posição vertical. **Anais do III Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências**,

2018. n. 83, p. 1–11.

MULLIS, K. B.; FERRE, F.; GIBBS, R. A. The Polymerase Chain Reaction. **Molecular Diagnostics**. Totowa, NJ: Humana Press, 1994, p. 47–55.

NOGUEIRA FERRAZ, E. M.; NOGUEIRA RODAL, M. J.; SAMPAIO, E. V. S. B. Physiognomy and structure of vegetation along an altitudinal gradient in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Phytocoenologia**, 14 mar. 2003. v. 33, n. 1, p. 71–92. Disponível em: <http://www.schweizerbart.de/papers/phyto/detail/33/61396/Physiognomy_and_structure_of_vegetation_along_an_a?af=crossref>.

REYES-AGÜERO, J. A.; AGUIRRE R., J. R.; VALIENTE-BANUET, A. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. **Journal of Arid Environments**, 2006. v. 64, n. 4, p. 549–585.

SALEM, N. *et al.* Natural colourants analysis and biological activities. Association to molecular markers to explore the biodiversity of *Opuntia* species. **Phytochemical Analysis**, 2020. v. 31, n. 6, p. 892–904.

SENAR. **Cultivo da palma semiárido brasileiro**. [S.l.]: [s.n.], 2013.

SOUZA, D. C. F. De *et al.* Zoneamento agroclimático da palma forrageira (*Opuntia* sp.) para o estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, 28 fev. 2018. v. 12, n. 1, p. 2338–2347. Disponível em: <<http://www.inovagri.org.br/revista/index.php/rbai/article/view/715>>.

SUDENE; INSA. Documento de referência sobre palma forrageira. 2020. p. 14. Disponível em: <<https://www.gov.br/sudene/pt-br/centrais-de-conteudo/documento-de-referencia-palma-sudene-verso-05-03-20-final-pdf>>.

VIEIRA, D. P. Técnicas de PCR : Aplicações e Padronização de Reações. 1993. p. 1–18

REFERENCIAL TEÓRICO

Caracterização Botânica

O gênero *Opuntia* é angiosperma Eudicotiledônea e é membro da família de plantas suculentas *Cactaceae* (POTTIER-ALAPETITE, 1981; SHETTY *et al.*, 2012; AMANI *et al.*, 2019), incluem aproximadamente 130 gêneros com 1600 espécies de acordo com GIBSON, A. C. (1986) e BARTHLOTT *et al.* (1993).

Segundo NOBEL (2002), a palma forrageira *Opuntia* spp. pertence à família *Cactaceae* e a subfamília *Opuntioideae*, aonde são definidas suas sinapomorfias estruturais, tais como: (1) as aréolas têm gloquídios, isto é, espinhos de folhas caducas muito curtas e finas que têm farpas retrorsas e são facilmente desalojadas; (BAILEY IRVING W. 1963; GIBSON, A. C., 1986); (2) cada célula que compreende a camada cortical externa do caule possui uma grande drusa, isto é, um cristal agregado de oxalato de cálcio (BAILEY. 1963; GIBSON, 1986); (3) os grãos de pólen são poliporatos e possuem características microscópicas de exina peculiares (LEUENBERGER, 1975); (4) a semente é circundada por um envelope funicular, freqüentemente descrito como sendo um arilo (LEUENBERGER, 1975); e (5) traqueídeos especiais que ocorrem no xilema secundário (traqueídeos de banda larga) (MAUSETH, 1993); e traqueídeos vasculares que possuem apenas espessamentos anulares secundários (IRVING, 1963; BAILEY, 1966; GIBSON, 1977; e GIBSON, 1978). Além destas, existem outras características que podem distinguir esse grupo de plantas, porém não são verdadeiras sinapomorfias, já que isto significa, partilha de característica derivada de uma espécie ancestral comum por organismos de grupos taxonômicos diferentes.

Com relação à reprodução, segundo (REYES-AGÜERO *et al.*, 2006), existem nas espécies de *Opuntia*, sistemas de cruzamentos mistos, nos quais os níveis de autogamia e xenogamia mudam durante a época de floração ou de um local para outro. Ele cita como exemplo que em um local, a autopolinização foi registrada em 61,1% de uma população de *O. retrorsa* (do Chaco argentino), enquanto 67% das plantas em outro local apresentaram polinização cruzada (BIANCHI, *et al.*, 2000; BIANCHI, *et al.*, 2017).

Já a respeito das condições ideais para florescimento, INGLESE *et al.* (1995) afirmam que as primeiras investigações feitas por ALFONSO-SPAGNA (1884) dizem que as temperaturas diárias inferiores a 20°C evitam o reflorescimento da palma forrageira, isto

porque há a indução pela remoção do fluxo de primavera das flores e cladódios (INGLESE *et al.*, 1995).

Com relação aos cladódios da palma forrageira (*Opuntia spp.*), estes são largamente utilizados como forragem, servindo como fonte alimentar para os rebanhos, principalmente nas regiões áridas. MULAS e DESSENA (2019) identificaram que sua composição química tem potencial para a nutrição animal. No entanto, levando em consideração o baixo teor de nitrogênio, quando usado com essa finalidade, a biomassa do cladódio deve ser integrada a alimentos com alto teor de nitrogênio. Devido ao alto teor de Ca e K, o fruto também pode ser usado como suplemento alimentar desses elementos, mesmo que a maior parte do Ca não esteja disponível.

Em contribuição ao meio ambiente, devido ao seu metabolismo específico do ácido crassuláceo (CAM), o cacto não só é capaz de resistir à seca, mas também ajuda a restaurar as coberturas vegetativas do solo e converte água em matéria seca com mais eficiência do que outras espécies de plantas áridas. Por esta razão, de 700.000 a 1 milhão de hectares foram plantados nos últimos 50 anos no Norte da África (BENDHIFI *et al.*, 2013).

Centro de Origem

Segundo Gois e Ribeiro (2016), o gênero *Opuntia* tem o México como seu provável centro de origem (VALDEZ, 1994), já que segundo KIESLING (1998), evidências apontam que a sua domesticação ocorreu há pelo menos 9000 anos, através das espécies ancestrais desse país. Também pelo fato de existir um grande número de espécies em suas terras.

KYRIACOU *et al.* (2016), afirmaram que embora a diversidade genética expansiva em *Opuntia* seja encontrada nos países da América do Sul, principalmente no México, a introdução dessas espécies frutíferas no Velho Mundo, ocorreu possivelmente no século 16, e há muito fornece uma base genética naturalizada para o ressurgimento e valorização dessa cultura no sul da Europa nas últimas duas décadas (PIGA *et al.*, 2003; ALLEGRA *et al.*, 2015).

O que corrobora com GRIFFITH (2004) que fala sobre uma prevalente propagação clonal de *Opuntia* pela população humana inicial do Novo Mundo, aonde ocorreu a presença dessas plantas ainda na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, África do Sul, Índia, Tailândia e Austrália (LORD *et al.*, 1919). Acredita-se que a prevalência clonal casual da *Opuntia*, em

algumas regiões se dá devido a sua evidente predisposição na propagação vegetativa (GRANT; GRANT, 1971; MANDUJANO *et al.*, 1996), o que chega até a caracterizá-la como uma planta daninha nociva em determinadas localidades (DODD, 1936; NOBEL, 1994).

Para GRIFFITH (2004), a espécie *O. ficus-indica* era provavelmente distinta no começo do século 16 (DONKIN, 1977; CASAS; BARBERA, GIUSEPPE, 2002). As plantas também foram registradas no cultivo em Tlaxcala, México, em 1519 (Diaz del Castillo, 1632 em IDELL, 1957). Os frutos e rebentos de *Opuntia ficus-indica* também foram consumidos pelos Maias do sudeste do México (COE, 1994). Há indícios da utilização de *O. ficus-indica* pelos Nazca do Peru, colocando essas plantas na América do Sul em um período remoto da sua história (SEJURO NANETTI, 1990).

Importância Econômica

Existem evidências do uso de *Opuntia* como alimento humano pelo menos há 9.000 anos (KIESLING, 1998; GRIFFITH, 2004). Além da alimentação humana (frutas frescas e secas, sucos, etc.) e animal (forragem). A palma forrageira possui um vasto potencial para usos diversos, tais como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, cosméticos, adesivos, colas, corantes, antitranspirantes, além de usos medicinais (SOUZA *et al.*, 2018). Atualmente, também tem sido largamente utilizada como planta ornamental.

É importante ressaltar seu uso para a produção do corante de cochonilha, um produto secundário da *Opuntia*, em homenagem aos Astecas, conforme está desenhado no Codex Mendoza, fólio 44r, Biblioteca Bodleiana, Oxford University, Oxford, Reino Unido, ilustrado no trabalho de GRIFFITH (2004), que ainda cita que se a produção de corante de cochonilha foi um forte motivador econômico para o cultivo no mediterrâneo, provavelmente também influenciou fortemente a distribuição pré-colombiana. Este corante foi extremamente valioso para os europeus do início do século 16 ao final do século 19, e sua demanda influenciou fortemente a distribuição das plantações de *O. ficus-indica* na Sicília, nas Ilhas Canárias e no Norte da África (DONKIN, 1977).

No Nordeste brasileiro o uso de plantas adaptadas, como a palma forrageira, para compor a dieta animal é uma importante alternativa alimentar para criação de ruminantes na região semiárida sem perda do desempenho animal (ROCHA, 2012).

Na Paraíba, cultivos bem conduzidos de palma forrageira produzem uma biomassa superior a 150 toneladas de matéria verde/ha/ano (ou 15 toneladas de matéria seca/ha/ano), desde que se associem práticas agronômicas adequadas e variedades de elevado potencial produtivo (LUIZ; VIEIRA, 2006).

Marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat – Inter Repetições de Sequência Simples)

Os ISSR, assim como diversos tipos de marcadores moleculares, são amplamente empregados em estudos de caracterização, tanto para aplicações filogenéticas e evolutivas, quanto para fins práticos de conservação genética de espécies, fornecem informações relevantes à pesquisa científica (SOUZA, 2015). Foram desenvolvidos devido a necessidade de explorar repetições de microssatélites sem a necessidade do conhecimento prévio do sequenciamento do DNA da espécie-alvo e embora sejam marcadores dominantes (ZIETKIEWICZ et al., 1994), têm a vantagem de analisar loci múltiplos em uma única reação (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001). São largamente aplicados por possuírem uma metodologia acessível, ágil, competente, relativamente fácil de reproduzir e gerar altos índices de polimorfismo (REDDY et al., 2002; COSTA, 2010). A sua detecção requer o uso de poucos equipamentos e ainda é capaz de fornecer grande número de dados a um custo razoável (WOLFE, 2005).

Nessa técnica um único *primer* composto por uma sequência do microssatélite usualmente de 16-25bp de comprimento é utilizado para amplificar principalmente as sequências Inter-SSR de diferentes tamanhos. Estes primers podem estar desancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases degeneradas. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando à sequência repetida ou têm uma deleção ou uma inserção que modifica a distância entre as repetições. Para os primers ancorados na posição 5', polimorfismos ocorrem também devido às diferenças no comprimento do microssatélite. As sequências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente (COSTA, 2010).

É considerado um marcador semi-arbitrário, baseado no princípio da técnica de PCR, que envolve amplificações de segmentos de DNA, em presença de primers complementares (DE SOUZA et al., 2005). Os primers ISSR são mais robustos que os primers RAPD, pois

apresentam maior superfície de ancoragem e possuem maiores temperaturas de anelamento, aumentando a reprodutibilidade dos produtos. O método fornece resultados altamente reprodutíveis e gera abundante polimorfismo em muitos sistemas. A maioria das aplicações tem usado eletroforese no gel de Agarose ou de poliacrilamida (LIU; WENDEL, 2001)

Essa técnica foi utilizada em várias espécies de cultivares de diversos grupos taxonômicos, tais como, algodão, aonde LIU & WENDEL, (2001) pesquisaram os polimorfismos dos ISSR como sistema de marcadores genéticos; já GOULÃO; OLIVEIRA (2001) realizaram estudo sobre a caracterização molecular de cultivares de maçã (*Malus x doméstica Borkh.*); OZTURK; CEKIC (2018) estudaram a relação genética entre algumas cultivares de morango e a população F1 derivada dessas cultivares; Enquanto que, a diversidade genética de cultivares locais de milho (*Zea mays*) de South Amarasi, distrito de Kupang, na Indonésia, foi descrita no trabalho de USLAN; JANNAH (2020).

SINGH et al. (2021) realizaram a coleta e caracterização de pools de genes de banana (*Musa spp.*) Em Manipur (N.E. Índia) usando além dos ISSR, os marcadores PCR-RFLP e RAPD; Nesse mesmo ano ainda ocorreram os seguintes estudos: Diversidade genética de uma coleção global de recursos genéticos de milho em relação às atribuições de suas subespécies, origem geográfica e tolerância à seca (SOLIMAN et al., 2021); Caracterização fenotípica e molecular do germoplasma de *Capsicum* brasileiro (BRILHANTE et al., 2021); e a diversidade genética e características dos frutos de novos genótipos de morango híbrido superior (*Fragaria x ananassa* Duchesne ex Rozier) no trabalho feito por SARIDAS et al. (2021).

Em cactáceas, é possível citar o uso dos marcadores ISSR sendo utilizados, entre outros, para investigar a estrutura genética populacional de um cacto colunar polinizado por morcego amplamente difundido com o objetivo de analisar a variação genética dentro e entre as oito populações largamente separadas de *S. thurberi* em Sonora, México (BUSTAMANTE et al., 2016); como também para o estudo da conservação in vitro e diversidade genética de espécies ameaçadas de *Melocactus* (Cactaceae) na Bahia, feito por TORRES-SILVA et al. (2021) e ainda para distinguir três espécies de Pitayas (*Hylocereus spp.*) cultivadas nas Ilhas Andaman e Nicobar, da Índia usando além dos traços moleculares, os morfológicos e bioquímicos (ABIRAMI et al., 2021).

Uso de marcadores moleculares na caracterização de Palma forrageira (Opuntia spp.).

Nos últimos 10 anos, a análise molecular vem contribuindo significativamente para os mais variados objetivos na pesquisa de *Opuntia*. O trabalho mais recente utilizando marcadores ISSR (do inglês, Inter Single Sequence Repeats) nessa espécie foi o estudo de cinco espécies para a síntese de AuNPs nos xaropes de cactos, aonde para sintetizar as nanopartículas de ouro (AuNPs), explorou-se o potencial de redução e capeamento de cinco espécies de cactos ricas em polifenólicos, com base nas características de AuNPs sintetizadas, como concentração, pH, temperatura e tempo de síntese (SOLTANI et al., 2021).

O uso de marcadores IRAP para detectar eventos de integração de retrotransposon em *Opuntia* e comparar polimorfismos IRAP e ISSR foi pesquisado por VALADEZ-MOCTEZUMA et al. (2019). Já BEZERRA (2018) avaliou a diversidade genética entre sete indivíduos de palma forrageira, com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*, usando os marcadores ITS, RAPD e ISSR; nesse mesmo ano foi realizado ainda um estudo por GARCÍA-MORALES et al. (2018) sobre a Influência da dispersão de frutos na diversidade genotípica e taxas de migração de um cacto clonal do deserto de Chihuahuan aonde utilizaram os genótipos multilocus (marcadores ISSR) de todos os indivíduos em 10 aglomerados por população com origem reprodutiva conhecida (sexual ou clonal).

A diversidade genética da coleção de figos da Barbária (*Opuntia ficus-indica*) na Grécia com marcadores moleculares ISSR foi analisada por GANOPOULOS et al. (2015) e por VALADEZ-MOCTEZUMA, et. al (2015);

VALADEZ-MOCTEZUMA et al., (2015) pesquisaram a diversidade genética de cultivares de *Opuntia* usando análise de PCR-RFLP com base no gene *fruitfull*. Enquanto as relações filogenéticas de 15 espécies de *Opuntia* do sul da América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai), foram analisadas por REALINI et al., (2015) usando o marcador ISSR.

Os marcadores moleculares também tiveram seu uso no Isolamento e caracterização molecular de bactérias endofíticas associadas à palma forrageira (*Opuntia spp.*) por SILVA et al. (2013); na variabilidade genética de *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera, Dactylopiidae) em palma forrageira no nordeste do Brasil (SILVA et al., 2013); no padrão de distribuição espacial de uma espécie clonal (ANGELES et al., 2011); na diversidade genética em clones

de cacto usando marcadores ISSR (SOUTO-ALVES *et al.*, 2009); e ainda na caracterização de *Opuntia* spp. por meio de sementes com marcadores RAPD e ISSR e sua possível utilização para diferenciação (LUNA-PAEZ *et al.*, 2007).

Porém, ainda há um déficit de informações sobre os cactos, principalmente estudos envolvendo a diversidade genética de populações naturais que poderiam posteriormente fornecer subsídios para melhoramento genético, programas conservacionistas e formação de bancos de germoplasma. Nesse contexto, estudos com diversidade genética podem elucidar eventos ao longo da vida. História e características ecológicas que podem ajudar a identificar grupos de populações vulneráveis aos fatores responsáveis pela erosão da diversidade genética (BARBOSA *et al.*, 2020).

Polymerase Chain Reaction - PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Thomas D. Brock e Hudson Freeze do Departamento de Microbiologia da Universidade de Indiana, na cidade de Bloomington, descreveram o órgão de bactérias termofílicas bactéria que resiste a variações extremas de temperatura e por esse motivo passou a ser utilizada na reação de PCR, dando-lhe o nome de *Thermus aquaticus* gen. n. e sp. n. (BROCK; FREEZE, 1969).

Anteriormente, Korneberg e colaboradores em 1958 descreveram a ação das enzimas DNA Polimerase (LEHMAN *et al.*, 1958), posteriormente a PCR foi proposta por KLEPPE, *et al.* (1971), embora não tenha feito sua aplicabilidade. Todo esse conhecimento serviu de base para que Kary Mullis em 1993 ganhasse o prêmio Nobel, se tornando o grande precursor desse processo que chamou de reação em cadeia da polimerase ou (inevitavelmente) PCR. “Várias modalidades foram concebidas que permitem não apenas extrair uma sequência específica de um modelo complexo e amplificá-la, mas também para aumentar a especificidade inerente deste processo usando conjuntos de primers aninhados ou para anexar informações de sequência a um ou ambas as extremidades da sequência conforme ela está sendo amplificada, ou para construir uma sequência inteiramente a partir de fragmentos sintéticos” (MULLIS, *et al.*, 1986).

A PCR tem de forma surpreendente, transformado a maneira como se faz biologia. Tornou-se parte integrante do laboratório de DNA, pois nesse processo, as sequências do DNA podem ser amplificadas, utilizando-se primers complementares àquelas

localizadas em locais específicos do genoma, ocorrendo a extensão do fragmento de DNA a partir dos primers, pela ação de uma DNA polimerase termoestável, a Taq (Thermus aquáticus) DNA polimerase, sob as variações de temperatura programadas (MULLIS, *et al.*, 1994).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEGRA, A. *et al.* The influence of harvest period and fruit ripeness at harvest on minimally processed cactus pears (*Opuntia ficus-indica* L. Mill.) stored under passive atmosphere. **Postharvest Biology and Technology**, 2015. v. 104, p. 57–62. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521415000356>.

AMANI, E. *et al.* Morphological variability of prickly pear cultivars (*Opuntia* spp.) established in ex-situ collection in Tunisia. **Scientia Horticulturae**, 2019. v. 248, n. December 2018, p. 163–175. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.004>>.

ANGELES, I. G. C. *et al.* Spatial distribution pattern of a clonal species: Effects of differential production of clonal and sexual offspring. **Evolutionary Ecology**, 2011. v. 25, n. 6, p. 1357–1383.

BAILEY IRVING W. (IRVING WIDMER). COMPARATIVE ANATOMY OF THE LEAF-BEARING CACTACEAE, IX: THE XYLEM OF PERESKIA GRANDIFOLIA AND PERESKIA BLEO. **Journal of the Arnold Arboretum.**, 1963. v. 44, p. 222–231. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/185665>.

BAILEY, I. W. THE SIGNIFICANCE OF THE REDUCTION OF VESSELS IN THE CACTACEAE Author (s): I . W . Bailey Source : Journal of the Arnold Arboretum , Vol . 47 , No . 4 (OCTOBER , 1966), pp . 288-292 Published by : Arnold Arboretum of Harvard University Stable URL : [htt. Jour Arnold](http://www.jstor.org/stable/2342111)

BARBOSA, F. Dos A. *et al.* Genetic variability in populations of *Pilosocereus catingicola* (Gürke) Byles & Rowley subsp. *salvadorensis* (Werderm.) Zappi (Cactaceae). **Research, Society and Development**, 27 jun. 2020. v. 9, n. 8, p. e126985521. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/5521>.

BARTHLOTT, W., HUNT, D. R. **Flowering Plants · Dicotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants, vol 2. Cactaceae.** [S.l.]: [s.n.], 1993.

BENDHIFI, M. *et al.* Assessment of genetic diversity of Tunisian Barbary fig (*Opuntia ficus indica*) cultivars by RAPD markers and morphological traits. **Scientia Horticulturae**, 2013.

v. 158, p. 1–7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.04.015>.

BEZERRA, J.D.C.. Mecanismos de Resistência em Genótipos de Palma Forrageira à Infestação Por *Dactylopius opuntiae* associados ao perfil metabólico. Universidade Federal da Paraíba Universidade Federal Rural de Pernambuco Universidade Federal do Ceará, 2018. Tese de Doutorado, cap. IV, p 96 - 122. Disponível em: https://www.mendeley.com/catalogue/e0cb67ae-d84d-38bd-90677fb104d493b6/?utm_source=desktop&utm_medium=1.19.8&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%7B245a1a6f-6bbf-4a1b-b1c0-7adb8d508678%7D

BIANCHI, M. B. *et al.* Studies on the breeding systems of understorey species of a Chaco woodland in NE Argentina. **Flora**, 2000. v. 195, n. 4, p. 339–348.

BIANCHI, T. *et al.* Investigation of the aroma of commercial peach (*Prunus persica* L. Batsch) types by Proton Transfer Reaction–Mass Spectrometry (PTR-MS) and sensory analysis. **Food Research International**, 2017. v. 99, p. 133–146. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917301990>.

BRILHANTE, B. D. G. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of brazilian capsicum germplasm. **Agronomy**, v. 11, n. 5, 2021.

BRITTON NATHANIEL LORD *et al.* **The Cactaceae: descriptions and illustrations of plants of the cactus family**. [S.l.]: Washington :Carnegie Institution of Washington, 1919. V. v.2.

BROCK, T. D.; FREEZE, H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. **Journal of bacteriology**, 1969. v. 98, n. 1, p. 289–297.

BUSTAMANTE, E. *et al.* Population genetic structure of a widespread bat-pollinated columnar cactus. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–18, 2016.

CASAS, A.; BARBERA, Giuseppe. Mesoamerican Domestication and Diffusion. **CactiBiology and Uses**. [S.l.]: University of California Press, 2002, p. 142–162.

COE, S. D. **America's first cuisines**. , Austin, Texas, USA: [s.n.], 1994

COSTA, J. C. da. Utilização de Marcadores ISSR na Caracterização de Cultivares. p. 17, 2010.

DE SOUZA, V. Q. *et al.* Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, v. 64, n. 4, p. 569–575, 2005.

DODD, A. P. The Control and Eradication of Prickly-Pear in Australia. **Bulletin of Entomological Research**, 10 set. 1936. v. 27, n. 3, p. 503–517. Disponível em:

https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007485300058363/ty-pe/journal_article.

DONKIN, R. A. **Spanish Red An Ethnogeographical Study of Cochineal and the *Opuntia Cactus***. [S.l.]: Library of Congress Catalog Card Number 77-76426 International Standard Book Number 0-87169-675-4 US ISSN 0065-9746, 1977. V. 67.

GANOPOULOS, I. *et al.* Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers. **Plant Gene**, 2015. v. 2, p. 29–33. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plgene.2015.04.001>>.

GARCÍA-MORALES, E. *et al.* Influence of fruit dispersal on genotypic diversity and migration rates of a clonal cactus from the Chihuahuan Desert. **Ecology and Evolution**, 2018. v. 8, n. 24, p. 12559–12575.

GIBSON, A. C. Wood Anatomy of *Opuntias* with Cylindrical to Globular Stems. **Botanical Gazette**, 1977. v. 138, n. 3, p. 334–351. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/2473902>>.

GIBSON, A. C., And P. S. N. **The Cactus Primer**. [S.l.]: Harvard University Press, 1986.

GIBSON, A. Woody Anatomy of *Platyopuntias*. **Aliso**, 1978. v. 9, n. 2, p. 279–307. Disponível em: <<http://scholarship.claremont.edu/aliso>>.

GOIS, G. C.; RIBEIRO, W. S. **Descrição morfológica, origem, Domesticação, Dispersão Da palma forrageira e sua introdução no Brasil Glayciane**. Juazeiro Bahia: [s.n.], 2016b. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/310461277%0ACAPÍTULO>>.

GOIS, G. C.; RIBEIRO, W. S. forrageira e sua introdução no Brasil. 2016a. n. November.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, n. 1, p. 81–89, 2001.

GRANT, V.; GRANT, K. A. Dynamics of Clonal Microspecies in Cholla Cactus. **Evolution**, 27 mar. 1971. v. 25, n. 1, p. 144. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2406507>>.

GRIFFITH, M. P. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): New molecular evidence. **American Journal of Botany**, 2004. v. 91, n. 11, p. 1915–1921.

IDELL, A. **The Bernal Diaz chronicles: the true story of the conquest of Mexico**. New York, USA: [s.n.], 1957.

INGLESE, P.; BARBERA, G.; MANTIA, T. L.A. Research strategies for the improvement of cactuspear (*Opuntia ficus-indica*) fruit quality and production. **Journal of Arid Environments**, 1995. v. 29, n. 4, p. 455–468.

KIESLING, R. Origen , Domesticación y Distribución de *Opuntia ficus-indica*. **Journal of the professional association for cactus development**, 1998. v. 3, p. 10–19. Disponível em: <www.jpacd.org>.

KLEPPE, K. *et al.* Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. **Journal of Molecular Biology**, 1971. v. 56, n. 2, p. 341–361.

KYRIACOU, M. C.; EMMANOUILIDOU, M. G.; SOTERIOU, G. A. Asynchronous ripening behavior of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) cultivars with respect to physicochemical and physiological attributes. **Food Chemistry**, 2016. v. 211, p. 598–607. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.113>>.

LEHMAN, I. R. *et al.* Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. United States: **The Journal of biological chemistry**, jul. 1958. v. 233, n. 1, p. 163–170.

LEUENBERGER, B. E. Die Pollenmorphologie der Cactaceae und ihre Bedeutung für die Systematik. [S.l.]: [s.], 1975.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, n. 3, p. 205–208, 2001.

LUIZ, M.; VIEIRA, D. M. Universidade Federal da Paraíba - UFPB Centro de Ciências Agrárias - CCA Grupo de Pesquisa Lavoura Xerófila - GPLX Palma Forrageira (*Opuntia ficus indica* e *Nopalea cochenilifera*) Areia - PB Julho - 2006. 2006.

LUNA-PAEZ, A.; VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; BARRIENTOS-PRIEGO, A. F. Characterization of *Opuntia* spp . by means of seed with RAPD and ISSR markers and its possible use for differentiation Caracterización de *Opuntia* spp . Mediante Semilla con Marcadores RAPD e ISSR y su Posible Uso Characterization of *Opuntia* spp . by Means. 2007. n. July 2014.

MANDUJANO, M. D. C.; MONTANA, C.; EGUIARTE, L. E. Reproductive Ecology and Inbreeding Depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in the Chihuahuan Desert: Why are Sexually Derived Recruitments so Rare? **American Journal of Botany**, jan. 1996. v. 83, n. 1, p. 63. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/j.1537-2197.1996.tb13875.x>>.

MAUSETH, J. Water-storing and Cavitation-preventing Adaptations in Wood of Cacti. **Annals of Botany**, jul. 1993. v. 72, n. 1, p. 81–89. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1006/anbo.1993.1083>>.

MULAS, M.; DESSENA, L. Quantitative and qualitative analysis of cladodes from new selections of *Opuntia ficus-indica*. **Acta Horticulturae**, 2019. v. 1247, p. 155–161.

MULLIS, K. B.; FERRE, F.; GIBBS, R. A. The Polymerase Chain Reaction. **Molecular Diagnostics**. Totowa, NJ: Humana Press, 1994, p. 47–55.

MULLIS, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, 1986. v. 24, n. Table 1, p. 17–27. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422010>>.

NOBEL, P. S. Remarkable Agaves and Cacti. **Oxford University Press, New York**, 1994.

OZTURK ERDEM, S.; CEKIC, C. The genetic relationship between some strawberry cultivars and F1 population derived from these cultivars. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 16, n. 3, p. 2983–2993, 2018.

PARK S. NOBEL. **Cacti_Biology and uses**. [S.l.]: [s.n.], 2002. V. 148.

PIGA, A. *et al.* Changes in ascorbic acid, polyphenol content and antioxidant activity in minimally processed cactus pear fruits. **LWT - Food Science and Technology**, 2003. v. 36, n. 2, p. 257–262. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364380200227X>>.

PORTO EDITOR. Dicionario infopedia da Lingua Portuguesa. **Porto editora**, 2000. Disponível em: <<https://www.infopedia.pt/dicionarios/lingua-portuguesa/sinapomorfia>>.

POTTIER-ALAPETITE, G. **Flore de la Tunisie: angiospermes, dicotylédones. Gamopétales. 2**. [S.l.]: Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture, 1981.

REALINI, M. F. *et al.* Phylogenetic relationships in *Opuntia* (Cactaceae, Opuntioideae) from southern South America. **Plant Systematics and Evolution**, 2015. v. 301, n. 4, p. 1123–1134. REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9–17, 2002.

REYES-AGÜERO, J. A.; AGUIRRE R., J. R.; VALIENTE-BANUET, A. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. **Journal of Arid Environments**, 2006. v. 64, n. 4, p. 549–585.

ROCHA, J. E. Da S. Palma Forrageira no Nordeste do Brasil: Estado da Arte. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2012. p. 40.

SARIDAS, M. A. et al. Genetic diversity and fruit characteristics of new superior hybrid strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne ex Rozier) genotypes. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 68, n. 2, p. 741–758, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10722-020-01020-4>>.

SEJURO NANETTI, O. **Plantas medicinales utilizadas por los curanderos de Nasca: registro gráfico botánico**. Lima, Perú: [s.n.], 1990.

SHETTY, A. A.; RANA, M. K.; PREETHAM, S. P. Cactus : a medicinal food. 2012. v. 49, n. October, p. 530–536.

SILVA, D. M. P. *et al.* Genetic variability of *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera, Dactylopiidae) on forage cactus in northeast Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 2013. v. 12, n. 4, p. 5236–5246.

SILVA, M. L. R. B. DA *et al.* Isolation and molecular characterization of endophytic bacteria associated with forage cactus (*Opuntia* spp.). **Acta Horticulturae**, 2013. v. 995, p. 99–108.

SINGH, W. A. et al. Collection and characterization of banana gene pools (*Musa* spp.) in Manipur (N.E. India) using PCR–RFLP and RAPD and ISSR markers. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 44, n. 3, p. 671–684, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40415-021-00722-y>>.

SOLIMAN, E. R. S. et al. Genetic diversity of a global collection of maize genetic resources in relation to their subspecies assignments, geographic origin, and drought tolerance. **Breeding Science**, v. 71, n. 3, p. 313–325, 2021.

SOUTO ALVES, T. *et al.* Genetic diversity in cactus clones using ISSR markers. **Acta Horticulturae**, 2009. v. 811, p. 55–58.

SOUZA *et al.* Zoneamento agroclimático da palma forrageira (*Opuntia* sp.) para o estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, 28 fev. 2018b. v. 12, n. 1, p. 2338–2347. Disponível em: <<http://www.inovagri.org.br/re-vista/index.php/rbai/article/view/715>>.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: Uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 495–503, 2015.

TORRES-SILVA, G. et al. In vitro conservation and genetic diversity of threatened species of *Melocactus* (Cactaceae). **Biodiversity and Conservation**, v. 30, n. 4, p. 1067–1080, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10531-021-02132-8>>.

USLAN; JANNAH, N. Genetic diversity of local corn (*Zea mays*) cultivars from South amarasi, kupang district, indonesia by inter simple sequence repeats marker. **Biodiversitas**, v. 21, n. 3, p. 1208–1214, 2020.

VALADEZ-MOCTEZUMA, E. *et al.* Genetic diversity of *Opuntia* cultivars using PCR-RFLP analysis based on fruitfull gene. **Acta Horticulturae**, 2015. v. 1067, p. 349–354.

VALADEZ-MOCTEZUMA, Ernestina; ARROYO-ÁLVAREZ, E.; SAMAH, Samir. Activation of transposable elements and insertional polymorphism in *Opuntia* offspring as assessed by inter-retrotransposon amplified polymorphism markers. **Plant Biosystems**, 2019. v. 153, n. 3, p. 450–460. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1498404>>.

VALADEZ-MOCTEZUMA; SAMAH, Samir; LUNA-PAEZ, A. Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). **Plant Systematics and Evolution**, 2015. v. 301, n. 2, p. 737–747.

VALDEZ, C. A. F. **Producción, industrialización y comercialización del nopal como verdura en México**. Reporte de investigación. [S.l.]: CUESTAAM, 1994. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=gXDFFASp%5C_mUC>.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods in Enzymology**, v. 395, p. 134–144, 2005.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification** Genomics, 1994. .

OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade genética entre e dentro espécies de *Opuntias* do banco ativo de germoplasma do INSA, com base em marcador molecular ISSR, e indicar potenciais genitores para o programa de hibridação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Sugerir um protocolo extração de DNA para reação de PCR de *Opuntia* spp.;
- 2) Selecionar *primers* ISSR mais informativos para estudos genéticos em *Opuntia* spp.;
- 3) Estimar a variabilidade genética entre e dentro de espécies de *Opuntia* spp. do BAG INSA, utilizando marcador ISSR;
- 4) Apontar possíveis falhas de identificação fenotípica, com base em análise molecular;
- 5) Selecionar potenciais genitores entre e dentro das espécies, resistentes à cochonilha-do-carmim para o programa de melhoramento de *Opuntia* spp.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Foram coletadas raízes de 47 genótipos do gênero *Opuntia*, pertencentes a 4 espécies que apresentam fenótipos com resistência à cochonilha. Após testes de extração de DNA e reações em PCR, foi observado que 25 desses acessos, os quais estão ordenados por espécie (Tabela 1), amplificaram bandas visíveis para a análise molecular realizada no laboratório de biologia molecular do Instituto Nacional do Semiárido (INSA).

Tabela 1. Acessos, nome vulgar, origem e espécies de *Opuntia* spp., analisados neste estudo conservados *ex-situ* e pertencentes ao BAG do INSA.

Acesso	Nome Vulgar	Origem	Espécie
08	Polotitlán - V09	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. atropes</i> Rose
10	Negro Michoacán - V07	Uruapan, Michoacán, México	<i>O. atropes</i> Rose
13	Negro Michoacán - F07	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. atropes</i> Rose
14	Blanco San Pedro - V19	San Pedro de los Naranjos, Guanajuato, México	<i>O. atropes</i> Rose
32	Blanco michoacán - F08	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. atropes</i> Rose
76		Instituto Nacional do Semiárido	<i>O. atropes</i> Rose
85	Blanco Valtierra - F48	Valtierrilla, Guanajuato, México	<i>O. atropes</i> Rose
37	Tamazushale - V12	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
42	Palmeira PB1	EMEPA, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
51	G3. IPA-100419 - Clone 12 (F21)	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
59	G11. IPA-200205 - IPA Sertânia	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
63	G15. IPA-100423 - Clone 23 (Seleção de cruzamento)	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
64	G17. IPA-100425 - Clone 25 (Seleção telado)	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
65	G18. IPA-100426 - Clone 26 (Seleção telado)	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
66	G19. IPA-100427 - Clone 27 (Seleção telado)	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
46	Tapón pelón - T81	Campo Narro, Matehuala, San Luis Potosí, México	<i>O. robusta</i> Wendl.
62	G14. IPA-200149 - V19	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. robusta</i> var. <i>larreyi</i> (F.A.C. Weber) Bravo
12	Blanco San Pedro - F24	San Pedro, Guanajuato, México	<i>O. stricta</i> Haw
15	Oreja de elefante - V17	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. stricta</i> Haw
35	Oreja de elefante - F16	José Montero Guardados de Arriba, Miguel Alemán, Tamaulipas, México	<i>O. stricta</i> Haw
44	Palmeira PB3	EMEPA, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil	<i>O. stricta</i> Haw
75	Orelha de Elefante Mexicana	Instituto Nacional do Semiárido	<i>O. stricta</i> Haw
43	Palmeira PB2	EMEPA, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil	<i>O. undulata</i> Griffiths
57	G9. IPA-100431 - Clone 9 OEA	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. undulata</i> Griffiths
82	Xoconostle - T34	La Tinaja, San Diego de la Unión, Guanajuato, México	<i>O. joconostle</i> A. Web.

Coleta e preparo do material vegetal

Dos 25 acessos, previamente selecionados, foram retirados cladódios das plantas e após período de “cura” de 15 dias, foram plantados em bandejas de polietileno ($H = 5,0$ cm, $\varnothing = 22,16$ cm, $V = 1,0$ L), e mantidos em telado sombreado com bloqueio de 60% de luminosidade (Figura 2A). Após 25 dias do transplântio as raízes foram coletadas e postas em Eppendorf de 2,0 mL (Figura 2B).



Figura 2. Acessos de palma forrageira (*Opuntia* ssp.) cultivadas em bandejas de polipropileno sob telado com sombreamento de 60%. (A) Os 25 acessos usados neste estudo. (B) Coleta das raízes com auxílio de pinça e acondicionadas em tubos Eppendorf de 2,0 mL.

No laboratório, as raízes foram lavadas, secas em papel toalha, acondicionadas em sacos de papel pardo e acondicionadas em dessecador com sílica gel por 48 horas, para desidratação. Posteriormente, as raízes foram colocadas em tubos Eppendorf de 2 mL, junto com 3 “beads” de cerâmica, para maceração das mesmas no equipamento *Bead Ruptor*, em seguida, 2g desse macerado foi transferido para novos tubos Eppendorf de 2 mL.

Extração de DNA

Foram avaliados dois métodos de extração de DNA de palma forrageira. No método I, usou-se o Kit DNeasy Plant Mini® (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. No método II, empregou-se a metodologia tradicional CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987).

Método I

No método I foi utilizado o Kit DNeasy Plant Mini® (Qiagen), conforme indicações do fabricante: no *Eppendorf* com 200 mg do macerado de raiz, foi adicionado 400 μ l de tampão AP1 + 4 μ l RNase A, o qual foi homogeneizado e colocado em banho Maria por 10 minutos a 65°C, depois, o tubo foi agitado por inversão 3 vezes; foi acrescentado 130 μ l de tampão P3, misturado e incubado por 5 minutos no gelo; centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e aplicada na coluna QIAshredder Mini spine (cor lilás) e centrifugou-se a 14.000 rpm por 2 minutos. Transferiu-se o filtrado para novo tubo e adicionou-se 600 μ l de tampão AW1 e misturou-se com a pipeta. Foi transferido 650 μ l da amostra para coluna DNeasy Mini Spin (branca) a 8.000 rpm por 1 minuto. Foi descartado o filtrado. Essa operação foi repetida com o remanescente da amostra. A coluna DNeasy Mini Spin foi colocada em novo tubo de coleta de 2 mL. Foi adicionado 500 μ l AW2 e centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm e descartado o filtrado. Adicionou-se 500 μ l de tampão AW2 e centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm para secar a membrana. A coluna DNeasy Mini Spin foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e adicionou-se 100 μ l de tampão AE e esperou-se 5 minutos, depois, centrifugou-se por 1 minuto a 8000 rpm e a etapa anterior foi repetida. Por fim, o DNA foi suspenso em 200 μ l de tampão AE.

Método II

No Método II foi usada a metodologia proposta por Doyle e Doyle (1987): após a maceração no bead ruptor foi transferido o macerado para eppendorfs e adicionado 700 μ l de tampão de extração CTAB 2X pré-aquecido a 65°C, incubado as amostras em banho maria a 65°C por 40 min., agitando a cada 10 min, retirado do banho maria quando chegorn a TA e adicionar 600 μ l de CIA e misturado por 5 min. Então, foi centrifugado a 14000 x g por 10 min, transferida a fase aquosa para novo eppendorf, acrescentado novamente 600 μ l de CIA e centrifugado novamente, coletada a fase aquosa para novo eppendorf e adicionado isopropanol gelado na proporção de 1:1 e resfriado a -20°C por um período de 30min. a 1h, quando necessário, neste passo, foi possível guardar por até 24h a -20°C. Então foi centrifugado novamente por 5 mim. a 8000 x g, descartado o álcool e adicionado 800 μ l de etanol 70% e agitado por 2 min. Depois, centrifugado por 2 mim. a 6000 x g (lavando 2X).

Colocado em câmara de fluxo para secar o álcool do DNA, daí foi ressuspendido em tampão TE + RNase (de 30 a 40 μ L dependendo do tamanho do pellet). Colocado em banho maria por 30 min. a 37°C, e por fim, foi estocado a -20°C.

Qualidade e quantificação de DNA

Para estimar a qualidade e quantidade do DNA, o material foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando como tampão TBE 1X (tris, ácido bórico e EDTA) a 120 Volts por 30 minutos.

As alíquotas de 1 μ L de cada amostra de DNA, foram adicionados 4 μ L de tampão de corrida (loading buffer) e 2 μ L de *Sybr Gold*, as quais foram aplicadas nos poços de gel e a concentração das amostras foram estimadas, comparando-se visualmente pela intensidade da fluorescência das bandas de DNA com um padrão conhecido, Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder, e fotografadas sob luz UV em fotodocumentador L. Pix (Loccus Biotecnologia).

Oligonucleotídeos iniciadores (primers).

Foram avaliados 49 oligonucleotídeos iniciadores ISSR, cuja denominação e sequências 5' - 3' encontram-se na Tabela 2, destes somente 13 amplificaram bandas visíveis em gel de agarose.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores ISSR (Inter Single Sequence Repeats) e suas respectivas sequências, usados neste estudo.

Indicador	Sequência (5' – 3')
UBC801	ATATATATATATATATT
UBC802	ATATATATATATATATG
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
UBC813	CTCTCTCTCTCTCTT
UBC817	CACACACACACACAA
UBC818	CACACACACACACAG
UBC819	GTGTGTGTGTGTGTGA
UBC821	GTGTGTGTGTGTGTGT
UBC822	TCTCTCTCTCTCTCA
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG
UBC825	ACACACACACACACT
UBC826	ACACACACACACACC
UBC827	ACACACACACACACG
UBC829	TGTGTGTGTGTGTGTC
UBC830	TGTGTGTGTGTGTGTG
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
UBC838	TATATATATATATATARC
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
UBC843	CTCTCTCTCTCTCTRA
UBC844	CTCTCTCTCTCTCTRC
UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRG
UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGYG
UBC853	TCTCTCTCTCTCTCRT
UBC854	TCTCTCTCTCTCTCRG
UBC855	ACACACACACACACAYT
UBC857	ACACACACACACACAYG
UBC858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT
UBC859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC
UBC860	TGTGTGTGTGTGTGTGRA
UBC862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC
UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
UBC869	GTTGTTGTTGTTGTTGTT
UBC870	TGCTGCTGCTGCTGCTGC
UBC873	GACAGACAGACAGACA
UBC874	CCCTCCCTCCCTCCCT
UBC876	GATAGATAGACAGACA
UBC879	CTTCACTTCACTTCA
UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA
UBC881	GGGTGGGGTGGGGTG
UBC883	BVBTATATATATATATA
UBC884	HBHAGAGAGAGAGAGAG
UBC887	DVDTCTCTCTCTCTCTC

*Y = C ou T.

Reações de ISSR-PCR

As reações de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em um volume final de 25 µL, composto de 24,3 µL de Mix (água Mili-Q 15,5 µl + Tampão de reação 2,5 µl + MgCl₂ 4,0 µl + dNTPs 1,0 µl + #direto 1,0 µl + Taq polimerase 0,3 µl) e 0,7 µL de DNA genômico da amostra. O ciclo de amplificação foi realizado em um termociclador, conforme Mergulhão et al. (2012), com as seguintes temperaturas: 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 95°C (desnaturação do DNA); 35 segundos a 50°C (pareamento do *primer* ao DNA molde) e 50 segundos a 72°C (extensão dos *primers*), seguidos de 7 minutos a 72°C (extensão final dos fragmentos) e último ciclo a 4°C por 10 min.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose a 3,0% em tampão TBE 1X (tris, ácido bórico e EDTA) em corrente elétrica de 120 V, por aproximadamente duas horas, corados com *Sybr Gold* e fotografados usando um sistema de imagem Gel Logic 112Pro (Carestream). Os pesos moleculares dos produtos foram estimados usando um DNA padrão de 100 pb (Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder).

Análise de diversidade genética

A partir dos dados obtidos das reações de PCR com marcadores ISSR, foi construída uma matriz binária de 0 (zero) e 1 (um), fundamenta na leitura das bandas no gel, onde (0) indica ausência e (1) a presença da banda. Neste trabalho considerou-se loco polimórfico aquele em que a frequência do alelo mais comum foi igual 0,95 (NEI, 1976). A partir desta matriz binária foram estimadas as distâncias entre pares de indivíduos, gerando a matriz de dissimilaridade genéticas entre 25 acessos de *Opuntia* spp, com base no índice de dissimilaridade de JACCARD (1912), dada pela seguinte fórmula:

$d_j = 1 - S_j$, onde,

$$S_j = \frac{a}{(a + b + c)},$$

em que,

- a, presença da banda nos dois indivíduos, i e j .
- b, presença da banda no indivíduo i e ausência no indivíduo j .
- c, ausência da banda no indivíduo i e presença no indivíduo j .

As estimativas da matriz de dissimilaridade foram obtidas usando a função `distance` () do pacote `Ecodist` na linguagem R (GOSLEE, 2010).

Os agrupamentos hierárquicos a partir da matriz de distâncias genéticas foram obtido pelos método de WARD (1963), que se baseia na análise de variância, utilizando as somas de quadrados (SQ) dentre e entre grupos. Tanto a análise de *cluster* quanto os gráficos gerados foram realizados usando-se o pacote `factoextra` na language R (KASSAMBARA, 2017)

Para a definição do número de grupos, o corte do dendrograma foi realizado adotando-se o critério proposto por MOJENA (1977), que se baseia no tamanho relativo dos níveis de fusão (distâncias) no dendrograma, tendo por finalidade determinar o número de grupos que otimize a qualidade do ajuste do agrupamento aos dados. A análise de *bootstrap* foi realizada para verificar e dar suporte estatístico aos nós internos dos dendrogramas e utilizou-se o pacote `shipunov` na linguagem R.

A validação dos agrupamentos foi determinada por meio do cálculo do coeficiente de correlação cofenético (SOKAL E ROHLF, 1962), que é fundamentado na semelhança entre a matriz de distâncias obtidas pelas medidas de parença e a matriz de distâncias originais, e sua significância foi testada pelo teste de t de student a 5% de probabilidade.

A partir da matriz de dissimilaridade gerada pelo índice de similaridade de JACCARD (1912), os genótipos foram alocados em diferentes grupos obedecendo os critérios estabelecidos pelo método de otimização de Tocher (RAO, 1952), como segue:

Distancia média intragrupo

$$\bar{d}_i = 2 \frac{\sum_{j>i}^n \sum_{j'=i}^n d_{jj'}}{n(n-1)},$$

em que n , representa o número de acessos dentro do grupo i .

Distancia média intergrupo

$$\bar{d}_{ii'} = \frac{\sum_{j=1}^{n_1} \sum_{j'=1}^{n_2} d_{jj'}}{n_1 n_2},$$

onde n_1 e n_2 , são os números de acessos dentro dos grupos i e i' , respectivamente.

O coeficiente de correlação cofenética foi para o agrupamento de Tocher foi estimado conforme sugerido por SILVA *et al.*, (2013) usando a função `coph. tocher` do pacote `biotools` da linguagem R (SILVA, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados 25 acessos de *Opuntia* spp, pertencentes a seis espécies, assim distribuídas: *O. atropes* (OA, seis acessos), *O. stricta* (OS, cinco acessos), *O. undulata* (OU, dois acessos), *O. cochenillifera* (OC, oito acessos), *O. robusta* (OR, dois acessos) e *O. joconostle* (OJ, um acesso) (Figura 3). Esses acessos foram selecionados por apresentarem resistência a cochonilha do carmim e terem boas características forrageiras e bromatológicas e pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do INSA (Instituto Nacional do Semi Árido), pois de acordo com os estudos feitos por COSTA et al. (2016), os dados morfológicos e moleculares determinam de forma eficiente a diversidade genética entre genitores.

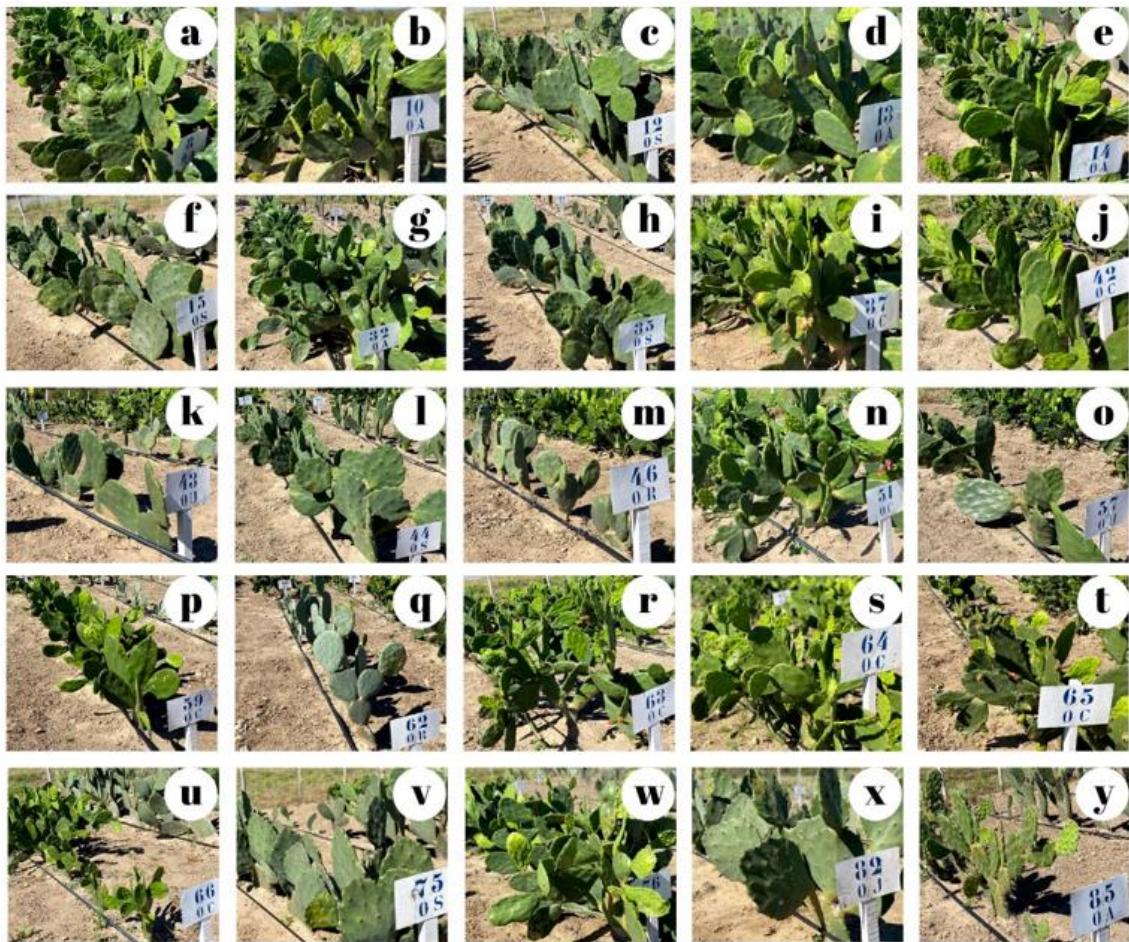


Figura 3. Acessos de *Opuntia* spp. utilizados na análise molecular com marcador ISSR: *O. atropes* (a, b, d, e, g, w, y); *O. stricta* (c, f, h, l, v); *O. undulata* (k, o); *O. cochenillifera* (i, j, n, p, r, s, t, u); *O. robusta* (m, q) e *O. joconostle* (x).

Todos os 25 acessos tiveram seus DNAs extraídos e purificados por dois métodos diferentes. O método I, Kit da Qiagen de purificação do DNA total de tecido de planta protocolo mini, mostrou-se mais eficiente do que o método II (Doyle e Doyle, 1987)(Figura 4). Mesmo o DNA de raízes de *Opuntia* spp., apresentam altas quantidades de polissacarídeos e mucilagem, dificultando sua extração. O Qiagen DNeasy Plant Mini Kit, contém sais altamente caotrópicos que permitem eliminar das amostras toda a mucilagem e polissacarídeos, resultando em amostras de DNA de boa qualidade e em quantidade acima de 200ng.

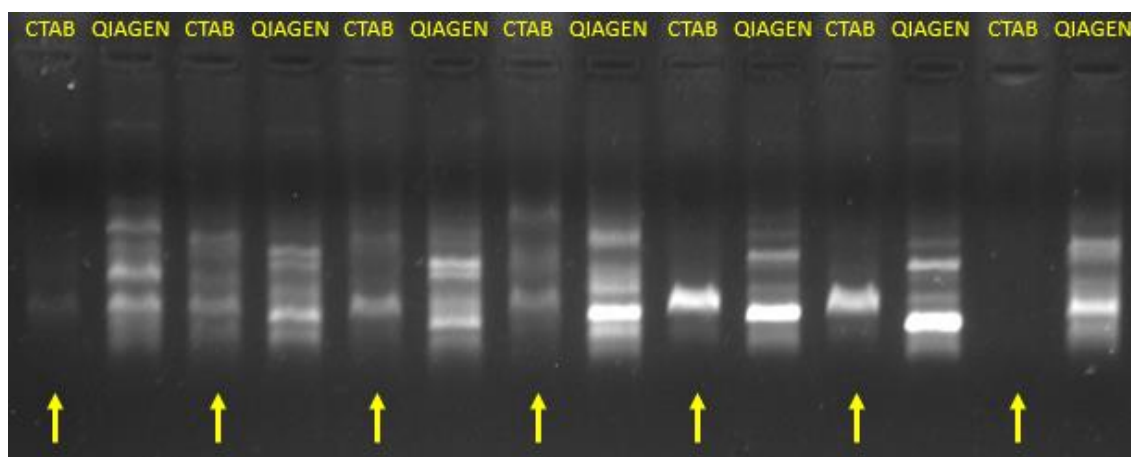


Figura 4. Perfil eletroforético de agarose a 3% comparando os métodos I e II de extração e purificação de DNA. O método I (Qiagen mini) produziu maior número de bandas e mais nítidas. As setas indicam falhas na amplificação parcial ou total de algumas bandas do método II.

O método de extração de DNA através do Qiagen DNeasy Plant Mini Kit também se mostrou eficiente quando utilizado por ABOUSEADAA et al., (2020), ao analisar espécies de cactáceas dos gêneros *Mammillaria* e *Notocactus*, corroborando com os nossos resultados. VIANNA et al. (2019) também conseguiu bons resultados ao utilizar o kit Qiagen ao estudar marcadores ISSR e SSR para determinar relações genéticas entre três espécies selvagens de *Passiflora*; BORGES et al., (2018) também usou esse kit quando pesquisou a diversidade genética em banco de germoplasma de cajuí (*Anacardium* spp.) Determinada por marcadores ISSR e ainda por MORAES et al. (2014) ao trabalhar com marcadores microssatélites polimórficos para o cacto raro e ameaçado de extinção *Uebelmannia pectinifera* (Cactaceae) e suas espécies congêneras.

Dos 49 oligonucleotídeos iniciadores ISSR utilizados neste estudo (Tabela 2), apenas 13 amplificaram bandas. A partir desses 13 primers ISSR foi possível amplificar um total de 1.091 bandas, distribuídas em 139 locos, dos quais, 125 são polimórficos e 14 monomórficos, o que representa 89,92% de polimorfismo, o maior número de bandas amplificadas por *primer* foi de 20 (dados não mostrados) e os *primers* em que apresentaram 100% de locos polimórficos foram 810, 834 e 842 (Tabela 3).

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores ISSR (*primers*), sequência 5' - 3', número total de bandas amplificadas (NTA), número de locos polimórficos (NLP), número de locos monomórficos (NLM), porcentagem de locos polimórficos (PCP), e tamanho dos fragmentos amplificados (TFA) entre 25 acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) do BAG do INSA, Campina Grande (PB).

Primers	Sequência 5'- 3'	NTA	NLP	NLM	PCP (%)	TFA
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	81	10	2	83,33	300-1500
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	50	8	1	88,89	400-2000
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	82	13	2	86,67	200-1000
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	164	16	0	100,00	100-1500
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	95	9	1	90,00	300-1000
UBC818	CACACACACACACACAG	16	3	1	75,00	300-1500
UBC825	ACACACACACACACACT	57	4	1	80,00	300-900
UBC827	ACACACACACACACACG	139	16	1	94,11	200-1500
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	125	10	0	100,00	200-2000
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	44	8	2	80,00	200-900
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	72	11	1	91,67	100-2000
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	89	9	0	100,00	200-800
UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	77	8	2	80,00	300-1500
Total		1091	125	14	89,92	-

*Y = C ou T.

Estes resultados evidenciam que há diversidade genética entre e dentro das espécies analisadas, aqui representadas pelos 25 acessos de *Opuntia* spp.

Em diversas culturas os marcadores ISSR se mostraram eficazes para acessar a diversidade genética, usados sozinhos ou em conjunto a outros tipos de marcadores moleculares. SINGH et al. (2021) reportaram que os utilizaram além dos marcadores PCR – RFLP e RAPD, o marcador ISSR para caracterizar o *pool* de genes de banana (*Musa* spp.) Em Manipur (N.E. Índia); SARIDAS et al. (2021) também usaram marcadores ISSR para analisar a diversidade genética de oito híbridos de morango proeminentes e seus pais. Outros autores também relataram a eficiência do uso dos marcadores ISSR em acessar a diversidade genética em Baru (GARCIA et al., 2020) e *Cereus* sp. (DAMAZIO DOMINGUES et al., 2017).

A caracterização molecular de *Opuntia* representa mais uma ferramenta para acessar a diversidade genética existente entre os acessos de palma forrageira do banco ativo de germoplasma (BAG) do INSA, e serve de apoio a taxonomia adequada e, principalmente, auxilia na escolha de possíveis progenitores em programa de melhoramento (VALADEZ-MOCTEZUMA et al., 2015).

Estudos recentes de caracterização de plantas de diferentes espécies usando marcador ISSR variam em número e polimorfismo de seus marcadores. Neste sentido, LUCIANA et al. (2017) ao realizar uma seleção de *primers* ISSR em *Melocactus conoideus* Buin. & Bred. (cactaceae), analisou um total de 23 primers, destes, 15 (65,2%) apresentaram marcas nítidas e possibilitaram a realização da análise de polimorfismo, para estes iniciadores, foi observado 118 marcadores no total, com média de 7,87 marcadores por *primer*.

BARBOSA et al. (2020), também avaliou a variabilidade genética em populações de *Pilosocereus catinicola* (Gürke) Byles & Rowley subsp. *salvadorensis* (Werderm.) Zappi (Cactaceae) usando marcador RAPD, dos cinco primers utilizados, foi possível gerar um total de 1.492 fragmentos. 82,4% dos fragmentos gerados eram polimórficos e 10,6% monomórficos, dessa forma consideraram alto o nível de polimorfismo encontrado nesta espécie, mostrando que há diversidade genética entre os 40 indivíduos estudados. Os 13 *primers* selecionados neste estudo apresentaram eficiência em produzir bandas nítidas e intensas (Figura 5) e podem ser considerados altamente polimórficos (89,92%), quando comparados aos resultados obtidos por AMARAL et al. (2020), ao analisar a diversidade genética da cactácea *Tacinga*, usando 15 marcadores ISSR, obtiveram uma taxa de apenas 7,87% de polimorfismo e GANOPOULOS et al. (2015) no seu trabalho com 22 acessos de *Opuntia ficus-indica*, usando 6 marcadores ISSR reportaram uma taxa média de 50,5% de polimorfismo.

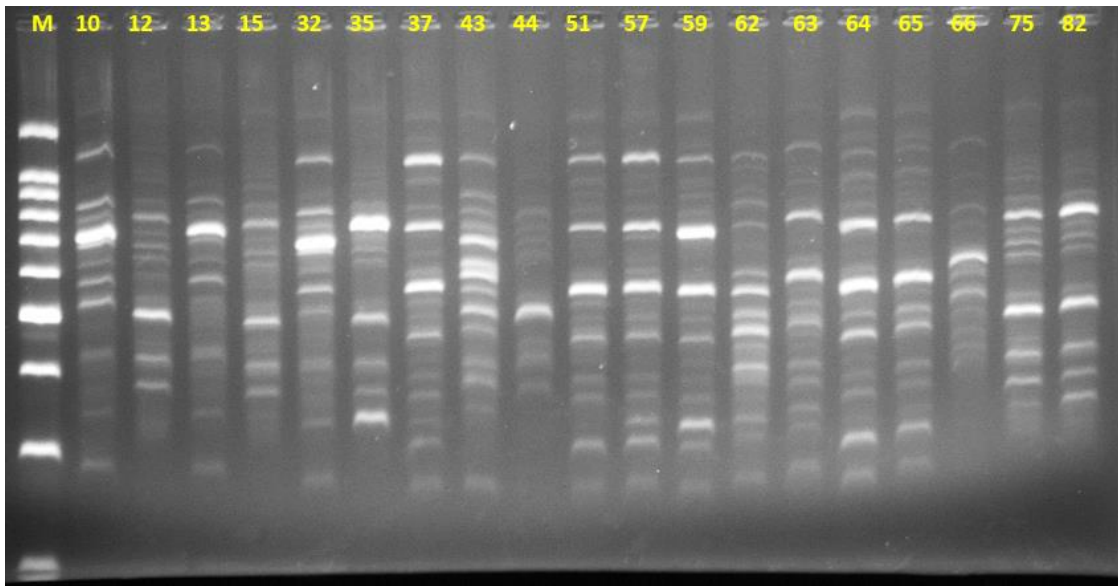


Figura 5. Perfil eletroforético em gel de agarose de 19 acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) gerados com o oligonucleotídeo iniciador ISSR UBC810. M, marcador de peso molecular ladder 100 bp.

Como os marcadores ISSR são *primers* universais, amplificam genomas aleatoriamente (KUSUMADEWI *et al.*, 2010) portanto, podem ou não se anelar ao DNA genômico se sitio de pareamento entre eles assim, os outros 36 *primers* falharam em amplificar bandas, possivelmente devido à falta de anelamento dos primers aos sítios ISSR no DNA genômico dos acessos de *Opuntia* spp. avaliados (Figura 6).

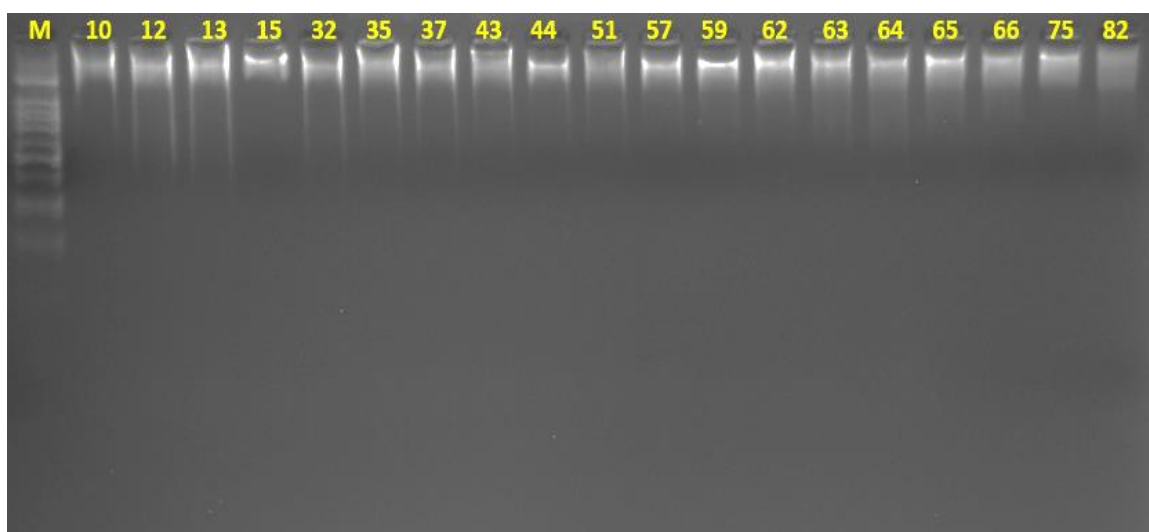


Figura 6. Perfil eletroforético de 19 acessos de *Opuntia* spp. em gel de agarose usando o primer ISSR UBC838. Não houve amplificação de nenhum loco. M, marcador de 1Kb ladder.

Na matriz de dissimilaridade genética obtida por meio do índice de similaridade de JACCARD (1912) (Figura 7), observa-se que quanto maiores os círculos e o vermelho mais intenso, indica maior dissimilaridade entre os acessos, ou seja, divergência genética entre os acessos. De acordo com POERBA; MARTANTI (2008), a influência da recombinação genética ocasiona o fato de que quanto menor o coeficiente de similaridade, mais iguais são os indivíduos e quanto maior mais dissimilares são eles (WIJAYANTO *et al.*, 2013).

A distância genética entre pares de acessos variou de 0,32 a 1,00 com uma média de 0,637. A menor distância entre pares de acessos (0,321) foi registrada entre os 75 x 82, os quais pertencem a espécies diferentes, *O. stricta* e *O. joconostle*, respectivamente. Possivelmente, este resultado inesperado seja devido a erro de identificação desses acessos no banco de germoplasma do INSA. Segundo Alves (comunicação pessoal), ao estudar os acessos 75 e 82, constatou através de análise citogenética que ambos são possivelmente, da espécie *O. stricta*, são plantas tetraploides apresentando $2n = 2x = 44$ cromossomos, com um 2C DNA de 3,35pg, corroborando os dados obtidos neste trabalho.

A menor distância entre acessos da mesma espécie (0,324), foi registrado entre os acessos 51 x 59 da espécie *O. cochenillifera*.

A matriz de dissimilaridade também revelou que há variabilidade genética entre os acessos de mesma espécie, por exemplo, entre os acessos 13 x 14, 75 x 76 e 76 x 85 da espécie *O. atropes*, com índice de divergência 1,0. Do mesmo modo, dentro da espécie *O. cochenillifera*, acessos 37 x 42, o que torna esses acessos os mais indicados para o programa de melhoramento de *Opuntia* dentre espécies. Essa diversidade dentro das espécies é interessante para realizar cruzamentos entre indivíduos mais divergentes e ampliar a variabilidade genética existente para praticar seleção em populações segregantes (BORÉM *et al.*, 2017).

A diversidade genética também foi alta, por exemplo, entre os acessos 37 x 14 e 37 x 76 das espécies *O. cochenilifera* x *O. atropes*, respectivamente, a dissimilaridade foi igual a 1,0 e por apresentarem mesmo nível de ploidia ($2n = 2x = 22$ cromossomos, de acordo com Alves (comunicação pessoal), por isso, estas espécies apresentam-se como potenciais genitores para o programa de melhoramento de *Opuntia* entre espécies. Embora essa relação também seja verdadeira para os acessos 42 x 44 e 42 x 75, das espécies *O. cochenilifera* x *O. stricta*, cuja dissimilaridade também foi extrema, igual a 1, mesmo a divergência sendo alta,

as vezes não é possível a realização de cruzamentos em função do nível de ploidia. *O. cochenilifera* é diploide ($2n = 2x = 22$ cromossomos) enquanto *O. stricta* é sabidamente tetraploide ($2n = 4x = 44$), conteúdo de 2C DNA de 3,35 pg (Alves, comunicação pessoal). A diversidade genética que aponta a quantidade de variação é uma informação valiosa para apoiar os esforços de conservação e reprodução (IHWAN et al., 2019).

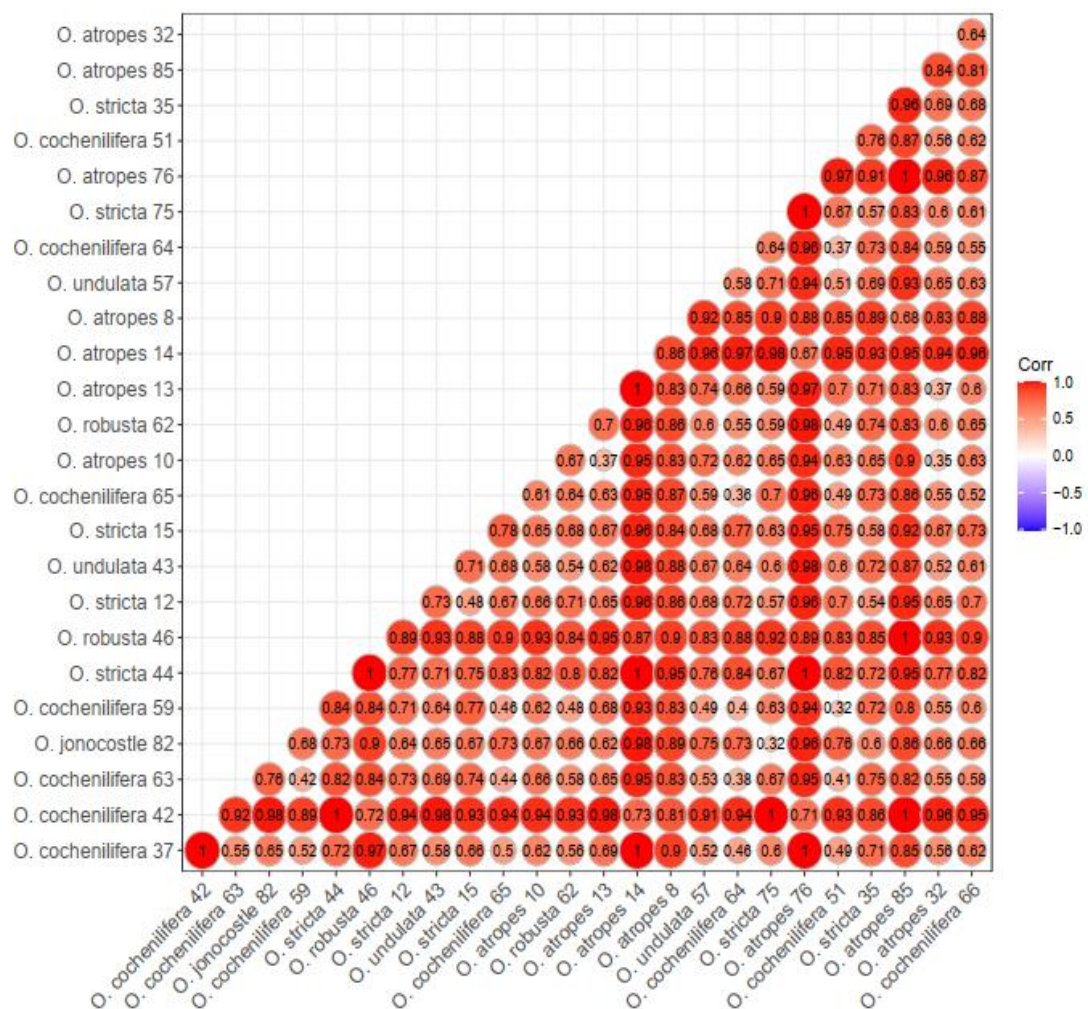


Figura 7. Matriz de dissimilaridade entre 25 acessos de *Opuntia* spp. do Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Nacional do Semi Árido (INSA), obtida por meio da distância genética de Jaccard (1912).

A alta variabilidade genética entre e dentro das espécies dos 25 acessos avaliados também está representada no dendrograma, o qual foi construído a partir dos dados da matriz de dissimilaridade, usando o método proposto por WARD (1963). Os 25 acessos de *Opuntia* spp. foram arranjados em *clusters* de similaridade genética e o ponto de corte estabelecido pelos

critérios de MOJENA (1977), possibilitou a formação de nove *clusters*. A consistência das bifurcações geradas por 1.000 iterações “bootstrap” variou de 7 a 100% entre os pontos de fusão do dendrograma (Figura 8).

O *cluster* I foi formado pelos acessos 8 e 85, ambos da espécie *O. atropes*, originários do México, respectivamente das regiões de Chapingo e Guanajuato. Os *clusters* II e IV, foram formados por um único acesso cada, o acesso 46 (*O. stricta*) oriundo de San Luis Potosí, México e o acesso 44 (*O. robusta*) da EMEPA de Lagoa Seca – PB, Brasil, enquanto que o *cluster* III, foi formado pelos acessos 42 (*O. cochenilifera*) sendo da EMEPA de Lagoa Seca – PB, Brasil, 14 (*O. atropes*) de San Pedro de los Naranjos, Guanajuato, México e 76 (*O. atropes*) que é de origem do INSA.

Os *clusteres* V (acessos 75 e 82) e VI (acessos 12, 15 e 35), são formados por acessos de *O. stricta*, sendo que os o acesso 75 é de origem do INSA, Paraíba, Brasil; o 82 de La Tinaja, San Diego de la Unión, Guanajuato, México, o acesso 12 é de San Pedro, Guanajuato, México; o 15 de Nopalera UACH, Chapingo, México e o 35 de José Montero Guardados de Arriba, Miguel Alemán, Tamaulipas, México. Embora esteja identificado como *O. joconostle*, o acesso 82 é *O. stricta*, aqui corroborando a hipótese de erro na identificação da espécie durante a implantação do BAG. De acordo com BORBA et al. (2005) trabalhando marcadores moleculares ISSR afirmaram que a ocorrência de erro na identificação das espécies é uma hipótese a ser considerada.

O grupo VII foi formado por três acessos de *O. atropes* (10, 13 e 32) sendo o acesso 10 oriundo de Uruapan, Michoacán, México e os acessos 13 e 32 de Nopalera UACH, Chapingo, México. Dos sete acessos de *O. atropes* avaliados neste estudo, três foram agrupados juntos e os demais acessos, dois estão formando o grupo I (8 e 85) e outros dois fazem parte do grupo III (14 e 76), com *O. cochenilifera* (42). Isso mostra que há grande diversidade genética dentre os acessos dessa espécie *O. atropes*.

O *cluster* VIII, foi formado por cinco acessos, todos de *O. cochenilifera* (51, 59, 63, 64 e 65) todos originários do IPA de Arcoverde, Pernambuco, Brasil. Entretanto, há outros acessos de *O. cochenilifera* participando de outros grupos. Como mencionado acima, o acesso 42 (grupo III) e o acesso 37 que têm origem de Nopalera UACH, Chapingo, México e o 66 do IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil, respectivamente, e que estão no último grupo. Isso mostra a variabilidade genética dentro da espécie e suas relações próximas com as espécies *O. atropes* e *O. undulata* ($2n = 2x = 22$), e com *O. robusta* ($2n = 4x = 44$). Embora, essa última seja

tetraploide, enquanto *O. cochenilifera* é diploide. Isso mostra que algumas relações entre os acessos não, necessariamente, se influenciam por fatores geográficos, pois baseado no trabalho de USLAN; JANNAH (2020) quando analisou a diversidade genética de cultivares locais de milho (*Zea mays*) por marcador SSR, foi observado que algumas populações apresentaram estreita relação genética, embora os demais não formem relações próximas, mesmo sendo originados da mesma população.

E, finalmente, o cluster IX, formado por uma miscelânea de acessos de diferentes espécies, *O. cochenilifera* (37 e 66), *O. robusta* (62) oriundas do IPA de Arcoverde, Pernambuco, Brasil e *O. undulata* (43 e 57) uma da EMEPA de Lagoa Seca, Paraíba, Brasil e outra do IPA de Arcoverde, Pernambuco,

A partir da matriz de dissimilaridade também foi realizado o agrupamento dos acessos utilizando o método de otimização de Tocher (Tabela 4). Os 25 acessos de *Opuntia* spp., formaram nove grupos distintos. Verifica-se que há certa correspondência entre os clusters do dendrograma e os agrupamentos formados pelo método de Tocher. Por exemplo, tanto pelo método de Ward quanto de Tocher, os acessos, 44 (*O. stricta*) e 46 (*O. robusta*) formaram grupos isolados, os acessos 8 e 85 (*O. atropes*), foram agrupados juntos e, os acessos 14, 76 (ambos de *O. atropes*) e 42 (*O. cochenilifera*) também foram juntos para o mesmo grupo, ou seja, o método de otimização de Tocher corrobora com a diversidade identificada pelo método de WARD (1963).

Contudo, o maior grupo observado pelo agrupamento de Tocher foi o grupo I, com 18 acessos de sete espécies diferentes, enquanto pela análise de cluster usando o método de Ward, esses acessos foram distribuídos em cinco grupos distintos (Figura 8).

Figura 8. Dendrograma construído pelo método Ward, com base na distância de JACCARD (1912), numa população de 25 acessos de *Opuntia* spp. a partir de 13 marcadores ISSR. A consistência das bifurcações gerada por 1.000 iterações "bootstrap" . A linha pontilhada marca o ponto de corte pelo critério de MOJENA (1977).

Tabela 4. Grupos formados através do agrupamento dos 25 acessos de *Opuntia* spp. do banco ativo de germoplasma do INSA feito no pacote Biotools, no software R (SILVA et al., 2017), com base no método de Tocher (RAO, 1952).

Grupos	Espécies	Acessos
I (18 acessos)	<i>O. stricta</i>	75, 35, 12 e 15
	<i>O. jonocostle</i>	82
	<i>O. atropes</i>	13, 32 e 10,
	<i>O. undulata</i>	43
	<i>O. cochenilifera</i>	37, 59, 51, 64, 63, 65 e 66
	<i>O. robusta</i>	62
	<i>O. undulata</i>	57
II	<i>O. atropes</i>	14 e 76
	<i>O. cochenilifera</i>	42
III	<i>O. atropes</i>	8 e 85
IV	<i>O. stricta</i>	44
V	<i>O. robusta</i>	46

O Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC) para o agrupamento de Tocher foi de 0,884** enquanto que a o Coeficiente de Correlação Cofenética obtido na análise de cluster foi 0,95***, evidenciando maior consistência no agrupamento hierárquico usando os critérios de Ward.

Os resultados obtidos nesse estudo reforçam o que afirmou ADRIANSYAH et al. (2019) e BELARMINO et al. (2017) sobre como a variação genética pode ser usada como base para esforços de conservação, programas de melhoramento e uso sustentável de recursos genéticos.

CONCLUSÕES

1. O material vegetal que mais se adequa à extração e purificação de DNA em *Opuntia* spp. são as raízes, em função de os cladódios apresentarem significativa quantidade de mucilagem;
2. O kit de extração e purificação de DNA da Qiagen foi mais eficiente do que o método CTAB, quando se utilizou raízes de *Opuntia* spp.;
3. Os marcadores moleculares ISSR mostraram-se eficientes na caracterização genética dos 25 acessos de seis espécies de palma forrageira (*Opuntia* spp.);
4. Os métodos de análise de dados, utilizados nesse trabalho, corroboram com a hipótese de que o acesso 82 (*O. joconostle*), na verdade é *O. stricta*, por apresentar alta similaridade ao nível molecular;
5. Entre as espécies, os acessos 37 x 14 e 37 x 76 das espécies *O. cochenilifera* e *O. atropes*, respectivamente, são os mais indicados como potenciais genitores, para o programa de melhoramento, já que têm dissimilaridade igual a 1 e tem mesmo nível de ploidia, $2n=2x=22$; e
6. Dentro das espécies, os acessos 13 x 14, 75 x 76 e 76 x 85 da espécie *O. atropes*, e da espécie *O. cochenillifera*, os acessos 37 x 42, com índice de divergência 1, são os mais indicados como potenciais genitores para o programa de melhoramento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSEADAA, H. H. et al. Gene-targeted molecular phylogeny, phytochemical profiling, and antioxidant activity of nine species belonging to family Cactaceae. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 27, n. 6, p. 1649–1658, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.03.007>>.

ADRIANSYAH, F. et al. Pendekatan PCR-RAPD dalam Menentukan Kekerabatan dan Konservasi Padi Varietas Lokal Sumatera Selatan. *Jurnal Lahan Suboptimal*, v. 7, 2019.

AMARAL, D. O. J. Do *et al.* Seleção de primers polimórficos para estudo de diversidade genética em cactáceas. **Multi-Science Journal**, 21 jan. 2020. v. 2, . 3, p. 9. Disponível em: <<https://ifgoiano.edu.br/periodicos/index.php/multiscience/article/view/1074>>.

BARBOSA, F. Dos A. *et al.* Genetic variability in populations of *Pilosocereus catingicola* (Gürke) Byles & Rowley subsp. *salvadorensis* (Werderm.) Zappi (Cactaceae). **Research, Society and Development**, 27 jun. 2020. v. 9, n. 8, p. e126985521. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/5521>>.

BELARMINO, K. S. et al. Genetic diversity in a *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz population assessed by RAPD molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 16, n. 3, 2017.

BORBA, R. da S. et al. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 4, p. 565–569, 2005.

BORGES, A. N. C. et al. Research Article Genetic diversity in a cajuí (*Anacardium spp.*) germplasm bank as determined by ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 17, n. 4, p. 1–14, 2018. Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/articles/year2018/vol17-4/pdf/gmr18212_-_genetic-diversity-caju-anacardium-spp_2.pdf>.

COSTA, M. P. S. D. et al. Characterization and genetic diversity of pepper (*Capsicum spp*) parents and interspecific hybrids. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 2, 2016.

C. RADHAKRISHNA RAO. Advanced statistical methods in biometric research. By C. Radhakrishna Rao. John Wiley & Sons, Inc., New York, N. Y. 1952. 390 pp. **American Journal of Physical Anthropology**, jun. 1952. v. 12, n. 2, p. 268–270. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajpa.1330120224>>.

DAMAZIO DOMINGUES, S. et al. Seleção de primers para análise de Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) em *Cereus sp.* (Cactaceae). *Revista Biotecnologia & Ciência*, v. 6, n. 2, p. 46–54, 2017.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf. Phytochemical Bulletin.** Disponível em: https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf.

FONSECA, L. fundamentais para a Engenharia Genética. 2021. p. 1–11. Disponível em: <https://profissaobiotec.com.br/5-ferramentas-fundamentais-para-a-engenharia-genetica/>.

GANOPOULOS, I. *et al.* Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers. **Plant Gene**, 2015. v. 2, p. 29–33. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plgene.2015.04.001>.

GARCIA, D. C. F. *et al.* Análise da Diversidade Genética do Baru usando Marcadores Moleculares ISSR. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 7, p. 48494–48459, 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/13585/11373>.

IHWAN, I. *et al.* Genetic diversity of *Rhizophora mucronata* in eastern region of Timor Island, Indonesia as revealed by RAPD. v. 20, p. 3364–3371, 2019.

JACCARD, P. THE DISTRIBUTION OF THE FLORA IN THE ALPINE ZONE. **New Phytologist**, fev. 1912. v. 11, n. 2, p. 37–50. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x>.

KARUNIAWAN, A.; SAHALA, B.; ISMAIL, A. Keanekaragaman Genetik Populasi *Mucuna* Berdasarkan Karakter Morfologi dan Komponen Hasil. *Zuriat*, v. 19, 2015.

KUSUMADEWI, Y.; POERBA, Y. S.; PARTOMIHARDJO, T. Keragaman Genetika Ramin [*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz] dari Provinsi Riau Berdasarkan Profil Random Amplified Polymorphic DNA. *Jurnal Biologi Indonesia*, v. 6, n. 2, p. 173–184, 2010.

LUCIANA, M. *et al.* SELEÇÃO DE PRIMERS INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATEM *Melocactus conoideus* BUIN. & BRED. (CACTACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DO SUDOESTE DA BAHIA, BRASIL. In: **Enciclopédia Biosfera**. [S.l.]: [s.n.], 2017. p. 1365–1374.

MORAES, E. M. *et al.* Polymorphic microsatellite markers for the rare and endangered cactus *Uebelmannia pectinifera* (Cactaceae) and its congeneric species. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 4, p. 10359–10366, 2014. Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2014/vol13-4/pdf/gmr4657.pdf>

POERBA, Y. S.; MARTANTI, D. Genetic variability of *Amorphophallus muelleri* Blume in Java based on Random Amplified Polymorphic DNA. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, v. 9, n. 4, p. 245–249, 2008.

R CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.**

ROSMAINA, R.; ZULFAHMI, Z. Genetic Diversity of *Eurycoma longifolia* Jack Based on Random Amplified Polymorphic DNA Marker. *Jurnal Manajemen Hutan Tropika*, v. 19, p. 138–144, 2013.

SARIDAS, M. A. et al. Genetic diversity and fruit characteristics of new superior hybrid strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne ex Rozier) genotypes. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 68, n. 2, p. 741–758, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10722-020-01020-4>>.

SILVA, A. R. DA; MALAFAIA, G.; MENEZES, I. P. P. Biotools: An R function to predict spatial gene diversity via an individual-based approach. **Genetics and Molecular Research**, 2017. v. 16, n. 2, p. 1–6.

SINGH, W. A. et al. Collection and characterization of banana gene pools (*Musa* spp.) in Manipur (N.E. India) using PCR–RFLP and RAPD and ISSR markers. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 44, n. 3, p. 671–684, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40415-021-00722-y>>.

USLAN; JANNAH, N. Genetic diversity of local corn (*Zea mays*) cultivars from South amarasi, kupang district, indonesia by inter simple sequence repeats marker. *Biodiversitas*, v. 21, n. 3, p. 1208–1214, 2020.

VALADEZ-MOCTEZUMA; SAMAH, Samir; LUNA-PAEZ, A. Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). **Plant Systematics and Evolution**, 2015. v. 301, n. 2, p. 737–747.

WARD, J. H. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. **Journal of the American Statistical Association**, mar. 1963. v. 58, n. 301, p. 236–244. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01621459.1963.10500845>>.

WIJAYANTO, T.; BOER, D.; ENTE, L. A. HUBUNGAN KEKERABATAN AKSESI PISANG KEPOK (*Musa paradisiaca* Formatypica) DI KABUPATEN MUNA Genetic Relationship of Kepok Banana (*Musa paradisiaca* Formatypica) Accessions in Muna Regency Based on Morphological Characters and RAPD Markers. *Jurnal Agroteknos*, v. 3, n. 3, p. 163–169, 2013.

WILLS, C.; NEI, M. Molecular Population Genetics and Evolution. **Evolution**, mar. 1976. v. 30, n. 1, p. 198. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/2407692?origin=crossref>>.

ZOGLAMI, N. *et al.* Molecular based assessment of genetic diversity within Barbary fig (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill.) in Tunisia. **Scientia Horticulturae**, 2007. v. 113, n. 2, p. 134–141.